

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



OCORRÊNCIA DE DERIVADOS AZOTADOS EM ALGUNS PRODUTOS
DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO INFANTIL: NITRATOS E NITRITOS

Ana Patrícia de Almeida Monteiro

MESTRADO EM
CONTROLO DE QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS

2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



OCORRÊNCIA DE DERIVADOS AZOTADOS EM ALGUNS PRODUTOS
DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO INFANTIL: NITRATOS E NITRITOS

Ana Patrícia de Almeida Monteiro

Dissertação orientada por:

- Prof. Doutora Cristina M. M. Almeida
- Prof. Doutora Maria Eduardo Figueira

MESTRADO EM
CONTROLO DE QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS

2014

RESUMO

Os nitratos (NO_3^-) são constituintes azotados que podem ser encontrados no meio ambiente em consequência do ciclo do azoto e da utilização de fertilizantes. Os nitritos (NO_2^-) são utilizados em maior escala como conservantes alimentares. Os fertilizantes azotados têm vindo a ser utilizados de forma excessiva, com o intuito de promover o crescimento das culturas, de forma a acelerar a produção de produtos hortícolas e a aperfeiçoar as características das culturas. Consequentemente, tem-se verificado um aumento do teor de nitratos nas plantas e no solo, resultando na contaminação dos recursos hídricos, os quais, podem de forma indireta contaminar também os produtos hortícolas. Estes géneros alimentícios representam assim, a maior fonte de exposição a nitratos. A toxicidade dos nitratos resulta da sua conversão em nitritos e em compostos N-nitroso, sendo a metahemoglobinémia um dos principais efeitos adversos do consumo de nitratos, que pode, nos casos mais graves, causar a morte.

A alimentação durante a infância revela-se de extrema importância para o desenvolvimento adequado das crianças, e é reconhecida a importância dos produtos hortícolas na composição de uma alimentação saudável e adequada. No entanto, as crianças estão mais expostas à toxicidade dos contaminantes destes alimentos, nomeadamente nitratos e nitritos, pois têm menor massa corporal e um sistema imunitário menos desenvolvido.

Neste contexto, com o objetivo de estudar a ocorrência de nitratos e nitritos em produtos vegetais e sopas destinadas à alimentação infantil, otimizou-se e validou-se um método de espectrofotometria de absorção molecular na região UV/visível com reação de Griess, após redução em coluna de cádmio.

O método espectrofotométrico sem solução de ativação é linear entre 0,30 – 5,0 mg NO_3^-/L , com uma boa correlação ($R^2 = 0,999$), preciso ($\text{DPR} \leq 12\%$) e exato (erro <

10%). O método espectrofotométrico com solução de ativação é linear entre 0,30 – 2,0 mg NO₃/L, com uma boa correlação ($R^2 = 0,997$) e exato (recuperação média de 92%).

Todas as amostras de produtos hortícolas analisadas apresentam teores de nitratos inferiores aos limites estabelecidos pela legislação vigente, variando o teor médio entre 64,9 e 1108 mg NO₃/kg, apesar de algumas amostras apresentarem concentrações de nitratos inferiores ao limite de quantificação do método. Os vegetais de folha verde apresentaram os níveis de nitratos mais elevados.

Todas as amostras de sopa apresentam teores de nitratos inferiores ao limite máximo estabelecido pela legislação em vigor, variando o teor médio de nitratos entre 15,2 e 149 mg NO₃/kg. Algumas amostras apresentam teores de nitratos inferiores ao limite de deteção do método. A sopa de alface frisada apresentou os teores médios mais elevados de nitratos (149 mg/kg NO₃).

Para avaliar a exposição ao consumo de vegetais efetuou-se o cálculo do Índice de Risco (IR), que ultrapassou o valor aceitável ($IR < 1$) na maioria das situações, em especial no caso do consumo de alface, feijão verde, espinafre e nabiça. O IR calculado para a avaliação da exposição de lactentes ao consumo das sopas confeccionadas foi superior ao admitido apenas no consumo de sopa de alface-frisada.

Palavras-chave: nitratos, alimentação infantil, EAM, metahemoglobinémia.

ABSTRACT

Nitrates (NO_3^-) are nitrogenous constituents that can be found in the environment as a result of the nitrogen cycle and the use of fertilizers. Nitrites (NO_2^-) are used on a larger scale as food preservatives. Nitrogenous fertilizers have been used excessively, in order to promote the growth of crops, to speed up the production of vegetables and enhance the characteristics of the cultures. As a result, there has been an increase of the levels of nitrates in plants and in the soil, resulting in the contamination of water resources, which may also indirectly contaminate vegetables. These foodstuffs represent the largest source of exposure to nitrates. The toxicity of nitrates results of its conversion into nitrite and N-nitroso compounds, being methemoglobinemia a major adverse effect from the consumption of nitrates, which in severe cases, can lead to death.

Feeding during childhood is extremely important for the proper development of children, and is recognized the importance of vegetables in the composition of a healthy and proper nutrition. However, children are more exposed to toxicity of the contaminants of these foods, in particular nitrate and nitrite, since they have lower body weight and less developed and immune system.

In this context, with the aim of studying the occurrence of nitrate and nitrite in vegetable products and soups which are destined to infant feeding, we optimized and validated one molecular absorption spectrophotometry method in UV/visible region with Griess reaction, after reduction in a cadmium column.

The Spectrophotometric method without activation solution is linear between 0,30-5,00 mg NO_3^-/L , with a good correlation ($R^2 = 0.999$), need ($\text{DPR} \leq 12\%$) and accurate (error $< 10\%$). The Spectrophotometric method with activation solution is linear between 0,30-2,00 mg NO_3^-/L , with a good correlation ($R^2 = 0.997$) and accurate (92% average recovery).

All vegetable samples analysed present nitrate levels below the limits established by current legislation, varying the average content between 64,9 and 1108 mg NO₃/kg, although some samples show nitrate concentrations below the limit of quantification of this method. Green leafy vegetables showed higher nitrate levels.

All the analyzed soup samples have nitrate levels below the maximum limit established by the legislation in force, ranging from the average content of nitrates between 15,2 and 149 mg NO₃/kg. Some samples show nitrate levels below the detection limit of the method. Kale soup presented higher average nitrate levels (149 mg/kg NO₃).

To assess exposure to vegetable consumption we executed the calculation of the Risk index (IR), which exceeded the acceptable value (IR < 1) in most situations, especially in the case of the consumption of lettuce, green beans, spinach and turnip. The calculated IR for the assessment of infants' exposure to the consumption of soups made was superior to the permitted only in consumption of beaded lettuce soup.

Key words: nitrates, infant feeding, EAM, methaemoglobinaemia.

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho deve-se ao contributo de diversas pessoas, às quais quero manifestar o meu sincero agradecimento.

À minha orientadora, a professora doutora Cristina Almeida, por todo o apoio, disponibilidade e orientação que deu ao longo de todo o trabalho. Agradeço toda a dedicação e paciência despendidas na orientação e correção da dissertação, assim como toda a enorme simpatia, boa disposição, conselhos e partilha de conhecimentos, fundamentais para a execução deste trabalho.

À professora doutora Maria Eduardo Figueira, minha co-orientadora, pelas indicações, pela simpatia e pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

À Dra. Lucília Vales e à D. Palmira que acompanharam de perto todo o trabalho experimental desenvolvido sempre com uma enorme simpatia e disponibilidade. Agradeço as palavras de incentivo e o carinho demonstrados.

À minha família que sempre me apoiou durante todo o percurso académico, e em especial à minha avó, pelo enorme amor e apoio, absolutamente indispensáveis. Agradeço a todos a paciência, carinho e palavras de incentivo.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, por todo o companheirismo, amizade e paciência que sempre demonstraram. À Raquel, à Márcia, à Inês, à Daniela, à Mónica, e a todos os restantes, o meu obrigado pela ajuda, pelas palavras de incentivo e por estarem sempre presentes.

E essencialmente, ao Ricardo, por todo o amor, carinho e paciência inesgotáveis que sempre teve ao longo de todo este percurso. O meu sincero obrigado por toda a ajuda, dedicação e compreensão infinita, e pela presença constante, nos bons momentos e nos momentos mais difíceis.

ÍNDICE

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
Agradecimentos.....	v
Índice.....	vii
Índice de tabelas	xiii
Índice de figuras.....	xvi
Símbolos e abreviaturas.....	xvii
 Introdução.....	 1
 Capítulo I – Nitratos e nitritos.....	 9
1. Generalidades	9
2. Fontes de contaminação.....	10
3. Vias de exposição.....	12
3.1. Alimentos.....	12
3.2. Água.....	14
4. Fatores que influenciam os níveis de nitratos nos vegetais	15
4.1. Fatores ambientais, agrícolas e genéticos	15
4.2. Armazenamento e processamento dos alimentos	17
5. Mecanismo de ação dos nitratos e nitritos	19
6. Toxicidade dos nitratos e nitritos	20
6.1. Metahemoglobinemia infantil.....	20
6.2. Carcinogenicidade	21

7. Caracterização do perigo	22
8. Relação risco <i>vs</i> benefício.....	23
Capítulo II – Alimentação infantil.....	25
1. Amamentação.....	25
2. Diversificação alimentar.....	26
2.1. Ordem de introdução de novos alimentos.....	26
2.2. Necessidades nutricionais do lactente.....	28
2.3. Regime alimentar dos 5 aos 12 meses	29
3. A importância dos produtos hortícolas na alimentação humana	30
3.1. Recomendações de manuseamento e preparação de produtos hortícolas	33
4. Suscetibilidade das crianças aos contaminantes alimentares.....	34
Capítulo III – Aspectos legais.....	37
1. Legislação nacional	37
2. Legislação comunitária.....	38
Capítulo IV – Metodologia analítica.....	43
1. Generalidades.....	43
2. Métodos de preparação da amostra.....	43
3. Métodos de análise de nitratos e nitritos em alimentos	44
3.1. Métodos analíticos normalizados	44
3.2. Métodos analíticos descritos na literatura	47
3.2.1. Método colorimétrico: reação de Griess	50
3.2.1.1. Processo de redução	51
4. Método analítico utilizado	52
5. Validação de métodos analíticos.....	52

5.1. Grau de exigibilidade.....	53
5.2. Definição dos parâmetros de validação	54
5.2.1. Avaliação indireta.....	54
5.2.1.1. Seletividade/Especificidade	54
5.2.1.2. Curvas de calibração: linearidade e gama de trabalho.....	55
5.2.1.3. Limiares analíticos.....	58
5.2.1.4. Sensibilidade	59
5.2.1.5. Precisão.....	60
5.2.1.5.1. Repetibilidade.....	61
5.2.1.5.2. Precisão intermédia	62
5.2.1.5.3. Reprodutibilidade.....	63
5.2.2. Avaliação direta.....	64
Capítulo V – Parte experimental.....	67
1. Equipamento e material.....	67
1.1. Equipamento.....	67
1.2. Material	68
2. Reagentes	68
2.1. Reagentes gerais.....	68
2.2. Padrões.....	69
3. Soluções	69
3.1. Soluções gerais	69
3.2. Soluções de calibração.....	70
3.3. Soluções padrão de controlo.....	71
3.4. Soluções para regeneração das colunas de cádmio	71
3.5. Soluções de ativação das colunas de cádmio.....	71

4. Validação do método de ensaio.....	72
4.1. Método colorimétrico direto	72
4.1.1. Linearidade	73
4.2. Método de redução pelo cádmio sem solução de ativação.....	74
4.2.1. Linearidade	74
4.2.2. Correlação entre os valores teóricos e experimentais.....	76
4.2.3. Gama de trabalho.....	76
4.2.4. Limiares analíticos (LOD e LOQ)	77
4.2.5. Precisão	77
4.2.5.1. Repetibilidade.....	77
4.2.5.2. Precisão intermédia	78
4.2.6. Exatidão.....	78
4.3. Método de redução pelo cádmio com solução de ativação	79
4.3.1. Estudo da linearidade	79
4.3.2. Gama de trabalho.....	79
4.3.3. Limiares analíticos (LOD e LOQ)	79
4.3.4. Precisão	80
4.3.5. Exatidão.....	80
5. Análise das amostras	81
5.1. Seleção das amostras.....	81
5.2. Preparação da amostra.....	82
5.2.1. Amostras vegetais	82
5.2.2. Sopas	82
5.3. Extração da amostra.....	83
5.4. Análise da amostra.....	83
5.5. Ensaio em branco	86

5.6. Análise de nitritos	86
5.7. Regeneração das colunas de cádmio	86
5.8. Cálculos.....	87
Capítulo VI – Resultados e discussão.....	89
1. Validação do método.....	89
1.1. Método colorimétrico direto.....	89
1.1.1. Estudo da linearidade.....	89
1.2. Método de redução pelo cádmio sem solução de ativação	91
1.2.1. Estudo da linearidade	91
1.2.2. Gama de trabalho	97
1.2.3. Limiares analíticos (LOD e LOQ).....	98
1.2.4. Precisão.....	99
1.2.5. Exatidão.....	100
1.3. Método de redução pelo cádmio com solução de ativação	101
1.3.1. Estudo da linearidade	101
1.3.2. Gama de trabalho.....	104
1.3.3. Limiares analíticos (LOD e LOQ).....	104
1.3.4. Precisão.....	105
1.3.5. Exatidão.....	106
2. Análise das amostras	107
2.1. Análise de vegetais	107
2.2. Análise de sopas	114
3. Avaliação da exposição	118
3.1. Avaliação da exposição no consumo de vegetais	119
3.2. Avaliação da exposição no consumo de sopas.....	122

Conclusão.....	127
Bibliografia e referências bibliográficas	131
Anexos	145
Anexo A – Classificação teórica dos vegetais de acordo com a concentração de nitratos	146
Anexo B – Método dos mínimos quadrados	149
Anexo C – Teste das áreas normalizadas	154
Anexo D – Análise de resíduos.....	156
Anexo E – Teste de RIKILT.....	158
Anexo F – Teste de Mandel ou Teste de Fisher/Snedecor	159
Anexo G – Teste de homogeneidade de variâncias.....	162

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela III.1	Teores máximos de nitratos presentes em determinados produtos hortícolas de folha e alimentos destinados à alimentação infantil, de acordo com o Regulamento (UE) n.º1258/2011	40
Tabela IV.1	Métodos analíticos normalizados utilizados na análise de nitratos e nitritos em água para consumo humano	45
Tabela IV.2	Métodos analíticos normalizados utilizados na análise de nitratos e nitritos em carnes, vegetais e produtos destinados à alimentação infantil	46
Tabela V.1	Critérios de aceitação para a definição do intervalo de linearidade	74
Tabela V.2	Composição das sopas destinadas à alimentação infantil e confeccionadas no laboratório	84
Tabela VI.1	Intervalo inicial de concentrações em nitritos para a avaliação da linearidade do método colorimétrico direto	90
Tabela VI.2	Intervalo de linearidade dos nitritos pelo método colorimétrico direto	91
Tabela VI.3	Testes estatísticos representativos do estudo da linearidade dos nitratos pelo método de redução pelo cádmio, sem solução de ativação	92
Tabela VI.4	Precisão das curvas de calibração representativas do intervalo de linearidade dos nitratos pelo método de redução pelo cádmio, sem solução de ativação	93
Tabela VI.5	Parâmetros da curva de calibração média para a análise de nitratos pelo método de redução pelo cádmio, sem solução de ativação	94

Tabela VI.6	Redução de nitratos a nitritos nas colunas de cádmio: percentagens de recuperação dos nitritos	97
Tabela VI.7	Limiares analíticos do método colorimétrico de redução pelo cádmio, sem solução de ativação	98
Tabela VI.8	Estudo da precisão do método de redução pelo cádmio, sem solução de ativação, em condições de repetibilidade e precisão intermédia	99
Tabela VI.9	Estudos de recuperação de nitratos em várias matrizes alimentares (vegetais) para o método de redução pelo cádmio sem solução de ativação (método de Griess)	100
Tabela VI.10	Resultados iniciais da gama de concentrações estudada para avaliação da linearidade do método de redução pelo cádmio, com adição de solução de ativação	102
Tabela VI.11	Limiares analíticos do método de redução pelo cádmio, com solução de ativação, com base em ensaios de repetibilidade e nos parâmetros da curva de calibração	105
Tabela VI.12	Estudo da precisão do método de redução pelo cádmio, sem solução de ativação, em condições de precisão intermédia	106
Tabela VI.13	Estudos de recuperação de nitratos em várias matrizes alimentares (sopas) para o método de redução pelo cádmio, com solução de ativação	106
Tabela VI.14	Teores de nitratos presentes em diversos tipos de vegetais comercializados em Portugal continental	108
Tabela VI.15	Concentração em nitratos nas sopas destinadas à alimentação infantil e confeccionadas em casa	115
Tabela VI.16	A análise da diferença de duplicados (DD %) dos extratos das sopas destinadas à alimentação infantil e confeccionadas em casa	116

Tabela VI.17	Avaliação da exposição a nitratos pelo consumo de vegetais para lactentes do sexo feminino (cálculo do IR)	120
Tabela VI.18	Avaliação da exposição a nitratos pelo consumo de vegetais para lactentes do sexo masculino (cálculo do IR)	121
Tabela VI.19	Avaliação da exposição a nitratos pelo consumo de sopas para lactentes do sexo feminino (cálculo do IR)	123
Tabela VI.20	Avaliação da exposição a nitratos pelo consumo de sopas para lactentes do sexo masculino (cálculo do IR)	124
Tabela A.1	Classificação dos vegetais de acordo com a sua concentração de nitratos, segundo o descrito na literatura	146
Tabela A.2	Classificação dos vegetais de acordo com a sua concentração de nitratos, segundo o descrito na literatura (continuação)	147
Tabela A.3	Classificação dos vegetais de acordo com a sua concentração de nitratos, segundo o descrito na literatura (continuação)	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1	A Nova Roda dos Alimentos	31
Figura IV.1	Reação de diazotação de Griess	50
Figura VI.1	Correlação entre os valores teóricos e experimentais da concentração em nitratos após passagem das soluções de calibração pela coluna de cádmio	96
Figura VI.2	Testes estatísticos para o estudo da linearidade pelo método de redução pelo cádmio, com adição de solução de ativação	104

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

a	Ordenada na origem (equação da reta: $y = a + bx$)
A	Teor de nitrito na solução da amostra lida a partir da curva de calibração
ADD	Average Daily Dose, ingestão diária média
ADI	<i>Acceptable Daily Intake</i> , dose diária admissível
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> , Associação Oficial de Químicos Analíticos
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
b	Declive da reta (equação da reta: $y = a + bx$)
CD	<i>Conductivity Detector</i> , detetor de condutividade
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> , eletroforese capilar
CE	Comissão Europeia
CIE	<i>Capillary Ion Electrophoresis</i> , eletroforese capilar iónica
C _A	Concentração do analito na amostra não fortificada
C _P	Concentração do padrão de fortificação
C _R	Concentração do analito na amostra fortificada
CSEC	<i>Chemical Suppression of Eluant Conductivity</i> , supressão química da condutividade do eluente
CV	Coeficiente de variação
CV _m	Coeficiente de variação do método
CV _r	Coeficiente de variação de repetibilidade
CV _R	Coeficiente de variação de reprodutibilidade
CV _{RI}	Coeficiente de variação de precisão intermédia
DACR	Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos na Cadeia Alimentar

DCD	<i>Direct Conductivity Detection</i> , detecção direta da condutividade
DD	Diferença de duplicados (em percentagem)
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo (em percentagem)
DS ²	Diferença de variâncias
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> , Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EN	<i>European Standard</i> , Norma Europeia
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> , Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
Er	Erro relativo, em percentagem
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EU	<i>European Union</i> , União Europeia
E.U.A	Estados Unidos da América
F	Valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> , Organização das Nações Unidas para a Alimentação
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> , Análise por injeção em fluxo
F1	Fator de diluição associado ao processo de preparação e análise da amostra
F2	Fator de diluição associado à toma de ensaio utilizada na redução
g	Símbolo de grama, unidade de medida de massa
Hb	Hemoglobina
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia líquida de alta eficiência
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> , Agência Internacional para a Investigação do Cancro

IC	<i>Ion Chromatography</i> , Cromatografia iónica
IEC	<i>Ion Exchange Chromatography</i> , Cromatografia de troca iónica
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
IR	Índice de Risco
ISE	<i>Ion-Selective Electrode</i> , Eléctrodo ião-seletivo
ISO	<i>International Standard Organization</i> , Organização Internacional de Normalização
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> , União Internacional de Química Pura e Aplicada
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> , Comité Conjunto de Peritos para os Aditivos Alimentares da FAO e OMS
kcal	Símbolo de Quilocaloria, unidade de medida de energia
kg	Símbolo do SI para a unidade básica de massa quilograma
L	Símbolo de litro, unidade de medida de volume
LC	<i>Liquid Chromatography</i> , Cromatografia líquida
LOD	<i>Limit of Detection</i> , Limite de deteção
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> , Limite de quantificação
m	Quantidade de amostra utilizada no ensaio
metHb	Metahemoglobina
mg	Símbolo do SI para a unidade de massa miligrama
mL	Símbolo de mililitro, unidade de medida de volume
MRC	Material de Referência Certificado
n	Número de ensaios ou número de amostras analisadas
N	Número de pontos de calibração da reta
nm	Símbolo do SI para a unidade de comprimento nanómetro
NO	<i>Nitric oxide</i> , Óxido Nítrico
NOEL	<i>No Observed Effects Levels</i> , Nível de efeito não observado
NP	Norma Portuguesa

NO ₂	Nitrito
NO ₂ ⁻	Ião nitrito
NO ₃	Nitrato
NO ₃ ⁻	Ião nitrato
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.a.	Pró-análise
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
p.c.	Peso corporal
r	Limite de repetibilidade
R	Coeficiente de correlação da reta
R	Limite de reprodutibilidade
R ²	Coeficiente de determinação da reta
R _i	Limite de precisão intermédia
Rec	Recuperação, em percentagem
RELACRE	Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
RfD	<i>Reference Dose</i> , Dose de referência
S _a	Desvio padrão da ordenada na origem (a)
S _b	Desvio padrão do declive da reta (b)
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i> , Comité Científico para a Alimentação Humana
S _{ri}	Desvio padrão dos resultados em condições de repetibilidade
S _{RI}	Desvio padrão dos resultados em condições de reprodutibilidade
SI	Sistema Internacional de Unidades
S ²	Variância
S _{y/x}	Desvio padrão residual da curva de calibração
t	Valor da variável de Student
UV	Radiação ultravioleta

V_A	Volume de amostra não fortificada
V_P	Volume do padrão de fortificação
V_R	Volume de amostra fortificada
V_T	Valor de teste
WHO	<i>World Health Organization</i>
x_{lab}	Valor experimental
x_v	Valor aceite como verdadeiro (material de referência certificado)
\bar{x}	Média dos valores obtidos
y	Valores individuais do sinal instrumental
ΔL	Variação do sinal instrumental
ΔC	Variação da concentração em relação à variação do sinal instrumental

INTRODUÇÃO

Os nitratos (NO_3^-) são constituintes azotados que ocorrem em diferentes condições no meio ambiente, quer através de processos naturais, em consequência do ciclo do azoto, quer por processos sintéticos, a partir de fertilizantes de síntese ou orgânicos (estrupe), sendo o ião nitrato a forma mais estável dos compostos oxidados de azoto (1-3).

Os nitratos (NO_3^-) e os nitritos (NO_2^-) podem ser encontrados, na forma de sais de nitrato e nitrito, na composição de fertilizantes (4-6), explosivos (5, 6), rodenticidas (5, 6), inseticidas (5, 6), fogo-de-artifício (5, 6) e pólvora (5, 6).

Os nitratos representam uma fonte de azoto essencial para o normal crescimento das plantas, uma vez que cerca de 90% do azoto requerido por estas se apresenta na forma de nitrato (1).

Com o objetivo de promover o crescimento mais rápido dos produtos hortícolas, de forma a maximizar a produção global de alimentos, e com o intuito de obter vegetais de maiores dimensões e com folhas mais vistosas, os processos de agricultura intensiva utilizam de forma excessiva e não racional fertilizantes azotados (1, 7). Esta utilização abusiva origina uma perturbação global do ciclo do azoto (8) e um aumento do teor de nitratos nas plantas e excesso de fertilizante no solo, que sofrendo processos de degradação e/ou lixiviação, resultam na contaminação dos lençóis freáticos e das águas superficiais (1, 2, 9).

O estrupe resultante da utilização de métodos intensivos de produção animal, assim como os esgotos urbanos, são também fontes primárias de nitratos, contribuindo para o aumento da poluição das águas com estes compostos (2).

Os nitritos são utilizados em menor escala na composição de fertilizantes químicos de síntese, sendo encontrados com maior frequência em aditivos alimentares, como

conservantes em alguns alimentos, principalmente em carne, produtos de charcutaria e peixe marinado (2, 9-12).

Assim, os nitratos, embora de grande importância por serem essenciais à formação da biomassa vegetal e animal, podem assumir o papel de contaminantes químicos veiculados pelos vegetais e pelas águas superficiais ou subterrâneas, destinadas à produção de água para consumo humano (1).

As principais fontes de exposição a nitratos e nitritos são a água e os alimentos (2, 9, 11, 13) e destes, os vegetais e os produtos cárneos constituem a principal fonte de exposição por ingestão (2, 9, 11, 13). Os produtos hortícolas são responsáveis pelos maiores níveis de exposição a nitratos (80-94 %) (2). O consumo médio de nitratos varia entre 52 e 156 mg/dia (10, 14), enquanto a ingestão média diária de nitritos é inferior a 2 mg por pessoa (10).

Os vegetais folhosos como a alface e o espinafre apresentam, por norma, concentrações mais elevadas de nitratos, enquanto órgãos de armazenamento como a batata, a cenoura, a cebola, as sementes e vagens de ervilhas e a planta do feijão apresentam concentrações mais baixas (11). Os vegetais de folha verde apresentam os níveis mais elevados de nitratos (11, 15).

O teor de nitratos e nitritos presente nos produtos hortícolas pode variar consoante inúmeros fatores: dentro da mesma espécie vegetal, em diferentes partes do mesmo vegetal (10, 13) e por influência de fatores ambientais, agrícolas e genéticos (2, 9-11, 14). Na Europa, registam-se concentrações superiores de nitratos em vegetais presentes em latitudes setentrionais e no inverno (16). Os produtos hortícolas produzidos em estufa apresentam normalmente teores mais elevados de nitratos (10, 11, 14), ao contrário dos cultivados em agricultura biológica, que tendem a apresentar concentrações mais baixas destes compostos (17). Os níveis de nitratos e nitritos em vegetais podem ainda ser influenciados por fatores como a duração e as condições de armazenamento e pelos diferentes tipos de processamento (11).

Os nitratos ingeridos são rapidamente absorvidos no trato gastrointestinal superior (18-20), passando posteriormente para a circulação geral (3, 21). Cerca de 5% dos nitratos ingeridos são reduzidos a nitritos na cavidade bucal (3, 10, 22), representando estes últimos cerca de 80% da exposição humana total a nitritos, sendo o restante proveniente dos alimentos (2). Os nitritos são precursores de N-nitrosaminas e outros compostos N-nitrosos, que são reconhecidamente carcinogénicos (2, 13, 19). Desta forma, o consumo de alimentos e água com teores excessivos de nitratos e nitritos, enquanto precursores de compostos tóxicos e carcinogénicos, pode ser encarado como um problema para a saúde humana (1).

No entanto, estas reações de nitrosação podem ser inibidas pela presença de ácido ascórbico ou outros antioxidantes (2, 3), frequentemente presentes em produtos hortofrutícolas.

A importância dos produtos hortícolas na alimentação humana é reconhecida há várias décadas. São ótimos fornecedores de substâncias biologicamente ativas, vitamina C e carotenóides, e bons fornecedores de minerais, água, hidratos de carbono, proteínas, vitaminas e fibras alimentares (23-28), sendo por isso componentes importantes de uma dieta saudável e ótimos aliados na prevenção de patologias graves (29, 30). Para além disso, enquanto laxantes e anti-diarreicos, são indispensáveis à normalização e facilitação natural do trânsito intestinal do lactente (31), e enquanto alimentos com baixo teor energético, são indispensáveis como substitutos da papa de cereais em lactentes com excesso de peso (31).

Os produtos hortícolas fazem parte dos primeiros alimentos a serem introduzidos na diversificação alimentar do lactente, através de um caldo ou puré de legumes (28, 32), substituindo inicialmente uma refeição à base de leite, e por volta dos 6 meses, duas refeições diárias, fazendo sempre parte da alimentação da criança ao longo do seu crescimento, até à idade adulta.

A toxicidade dos nitratos resulta da sua conversão em metabolitos e produtos de reação tóxicos e carcinogénicos (11, 33), como os nitritos e as N-nitrosaminas, entre outros compostos N-nitroso (2, 3, 11). De acordo com o IARC (International Agency for Research on Cancer), a ingestão de nitratos e nitritos é provavelmente carcinogénica para humanos (Grupo 2) em condições que possibilitem as reações de nitrosação endógena (3).

Um dos principais efeitos adversos dos nitratos para a saúde humana, e em especial para bebés, é a metahemoglobinémia infantil (34), patologia que resulta da oxidação da hemoglobina (Hb) a metahemoglobina (metHb) pelos nitritos, deixando esta de estar funcional na atividade de transporte do oxigénio para os tecidos (3). Esta patologia pode provocar cianose, fraqueza, hipoxia, e depressão do sistema nervoso central, podendo, em casos mais severos, causar a morte por asfixia (2, 35-38).

A maior suscetibilidade dos bebés está relacionada com o facto do seu sistema enzimático não estar completamente desenvolvido, com o seu pH gástrico elevado, com a grande quantidade de líquidos ingeridos em relação ao seu peso corporal (cerca de 3 vezes mais que num adulto), entre outros aspetos (3, 22, 35, 38).

O Scientific Committee on Food (SCF) definiu uma dose diária admissível (ADI) de 3,7 mg/kg peso corporal (p.c.)/dia para os nitratos e 0,06 mg/kg p.c./dia para os nitritos (11, 14).

Os limites máximos de nitratos encontram-se previstos em legislação comunitária. O Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro (39) fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, entre eles os nitratos. O Regulamento (UE) N.º 1258/2011 da Comissão, de 2 de Dezembro (40), altera o anterior documento no que diz respeito aos teores máximos de nitratos nos géneros alimentícios.

Em Portugal, a avaliação dos riscos químicos que afetam os consumidores é da responsabilidade da ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica), através da Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos na Cadeia Alimentar (DACR). No período de 2006 a 2008 foram emitidos pela DACR trinta e nove pareceres relativos a perigos químicos, tendo sido os nitratos em espinafres um dos perigos mais detetados, apesar dos níveis de exposição estimados tenham sido sempre inferiores à ADI definida (2).

Pela sua prevalência no meio ambiente, os nitratos e os nitritos tornaram-se um objeto de estudo em diversas áreas, criando-se a necessidade de desenvolver métodos analíticos sensíveis e seletivos para o doseamento destes iões em alimentos.

São vários os métodos analíticos normalizados para a quantificação de nitratos e nitritos em matrizes alimentares, desde métodos espectrofotométricos para produtos cárneos (41) e produtos destinados à alimentação infantil (42), colorimetria para carnes curadas (43, 44), espectrometria para produtos cárneos (45), fruta, vegetais e derivados (46) e produtos destinados à alimentação infantil (42), cromatografia de troca iónica (IEC) para produtos cárneos (47), cromatografia líquida de alta eficiência/ cromatografia iónica (HPLC/IC) para vegetais e derivados (48), entre outros.

Neste estudo foi utilizado um método de ensaio adaptado de uma Norma Europeia (48) para a análise de vegetais e alimentos à base destes, destinados à alimentação infantil, onde foi substituído o procedimento cromatográfico por um método de espectrofotometria na região do visível após aplicação da reação de Griess.

O trabalho desenvolvido tem como objetivo o estudo da ocorrência de derivados azotados em alguns géneros alimentícios destinados à alimentação infantil, tendo-se focado na análise de produtos hortícolas utilizados normalmente na confeção de alimentos destinados à alimentação de lactentes e crianças até aos 12 meses e na confeção e análise de alguns tipos de sopa mais comumente consumidas por crianças dessa faixa etária.

A implementação do método processa-se em várias etapas, nomeadamente:

- Implementar e validar um método colorimétrico com posterior deteção espectrofotométrica na região do visível, para a determinação de nitratos e nitritos em amostras alimentares;
- Otimização do método de extração de nitratos e nitritos dos alimentos com água quente e remoção de substâncias interferentes por adição de reagentes de Carrez;
- Dosear os teores de nitratos e nitritos em produtos hortícolas comercializados em Portugal Continental e que são utilizados na preparação de alimentos destinados à alimentação infantil;
- Dosear os teores de nitratos e nitritos em sopas confeccionadas em laboratório.

O trabalho foi organizado em capítulos, estando compreendidas uma parte teórica, uma parte experimental e uma parte referente às principais conclusões do estudo.

A parte teórica corresponde aos capítulos I, II, III e IV.

O capítulo I apresenta as características, as fontes de contaminação, as vias de exposição, o metabolismo, a ocorrência, os fatores que influenciam os teores, a toxicidade e a relação risco *vs* benefício, associados aos nitratos e nitritos.

O capítulo II faz referência à temática da alimentação infantil, englobando os principais aspetos relacionados com a amamentação e a diversificação alimentar, dando especial ênfase à importância dos produtos hortícolas na alimentação humana e, em especial, na alimentação de lactentes e crianças.

O capítulo III faz um enquadramento legal relativamente aos nitratos e nitritos em géneros alimentícios.

O capítulo IV apresenta os conceitos teóricos dos métodos analíticos utilizados na análise de nitratos e nitritos em géneros alimentícios, ao nível da preparação da

amostra e das metodologias analíticas aplicáveis, bem como os conceitos dos parâmetros de validação de métodos analíticos.

A parte experimental corresponde aos capítulos V e VI.

O capítulo V apresenta a metodologia analítica seguida ao longo do trabalho experimental, bem como o equipamento, materiais e reagentes necessários.

No capítulo VI são apresentados os resultados obtidos, assim como a discussão dos mesmos, desde a validação da metodologia até à análise das amostras de vegetais e sopas.

O capítulo VII apresenta as principais conclusões do trabalho realizado.

CAPÍTULO I

NITRATOS E NITRITOS

1. Generalidades

O nitrato (NO_3^-) e o nitrito (NO_2^-) são compostos iônicos constituídos pelos elementos químicos azoto (N) e oxigénio (O).

Entre os sais de maior importância destacam-se o nitrato de sódio (NaNO_3), o nitrato de amónio (NH_4NO_3), o nitrato de potássio (KNO_3), o nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) e o nitrato de magnésio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$) (4, 18). O nitrato de amónio é considerado o fertilizante mais importante do mundo (4), sendo também utilizado na produção de explosivos (5). O nitrato de potássio e o nitrato de sódio são utilizados principalmente em fertilizantes, e também como rodenticidas, inseticidas, e na produção de fósforos, fogo-de-artifício, explosivos e pólvora (5, 6). Os sais de nitrito mais comuns são o nitrito de sódio (NaNO_2) e o nitrito de potássio (KNO_2) (18). Praticamente todos os sais de nitrato e nitrito são solúveis em água, e apresentam-se normalmente sob a forma de pó esbranquiçado, quando não estão dissolvidos (5).

A produção de compostos azotados aumentou drasticamente durante a segunda metade do século XX, intencionalmente, devido à utilização de fertilizantes, ou não intencionalmente, como um subproduto da combustão de combustíveis fósseis (3).

2. Fontes de contaminação

Os nitratos podem ocorrer no meio ambiente, quer através de processos naturais, quer sintéticos, sendo o ião nitrato (NO_3^-), a forma mais estável dos compostos oxidados de azoto (2, 3). Estes compostos podem, portanto, surgir naturalmente nas plantas, em consequência do ciclo do azoto, ou formarem-se a partir de fertilizantes de síntese ou orgânicos (estrupe), ou ainda através da decomposição das plantas e de outros resíduos orgânicos (2, 9, 11). São vulgarmente encontrados no solo, na água e nos alimentos (13).

Para além de dióxido de carbono e água, as plantas necessitam de, pelo menos, seis elementos químicos para crescerem satisfatoriamente. Esses elementos são o azoto (N), o fósforo (P), o potássio (K), o cálcio (Ca), o enxofre (S) e o magnésio (Mg) (4), sendo o azoto o principal fator limitante do crescimento da maior parte das culturas (11). Os fertilizantes químicos foram criados com o objetivo de proporcionar às colheitas todos estes elementos essenciais, a fim de aumentar o rendimento e produtividade das mesmas, para fazer face a uma população mundial em contínuo crescimento (4, 11).

Os nitratos têm sido amplamente utilizados em atividades agrícolas desde o início do século XX, principalmente sob a forma de fertilizantes químicos de síntese (3). Estes compostos representam uma excelente fonte de azoto para as plantas, desempenhando por isso um papel importante na sua nutrição e crescimento (2, 11).

A utilização de fertilizantes azotados, principalmente em dose excessiva, representa a maior fonte de contaminação ambiental por nitratos (5), levando a um aumento do teor destes nas plantas e no solo (2, 7).

As plantas podem absorver o azoto diretamente sob a forma de nitrato, mas compostos como os sais de amónio e amoníaco têm de ser inicialmente convertidos em nitratos pelas bactérias no solo (4). Parte desse nitrato é absorvido pelas plantas

que o utilizam na síntese de proteínas vegetais, e o resto migra para as águas subterrâneas (2).

O estrume resultante da utilização de métodos de produção animal, assim como os esgotos urbanos, são também fontes primárias de nitratos, contribuindo desta forma para o aumento da poluição das águas com nitratos (2).

Para além da sua utilização enquanto componente de fertilizantes químicos de síntese, os nitritos são utilizados em grande escala como aditivos alimentares autorizados, principalmente como conservantes (2, 11, 12), na produção de carnes, peixe marinado e alguns tipos de queijos curados (2, 9, 10). Podem também ser encontrados em carne crua, bebidas espirituosas e licores (9).

A primeira utilização conhecida do nitrato e nitrito inorgânico é como conservante em alimentos curados, devido às suas propriedades antibacterianas (18). Em meados do século XX, tornou-se claro que os nitritos eram essenciais para o desenvolvimento da coloração rosa e do sabor característico dos produtos cárneos curados, e que a redução parcial de nitratos a nitritos por ação bacteriana era essencial no processo de cura e de fixação da cor. Mais tarde, tornou-se também evidente a importância da sua utilização no aumento do período de validade dos produtos cárneos e na inibição do crescimento bacteriano, incluindo da bactéria *Clostridium botulinum*, que está na origem do botulismo, uma intoxicação alimentar potencialmente fatal (3, 10).

O sais de nitrato de potássio e nitrito de sódio ou potássio continuam a ser utilizados nos dias de hoje no processo de cura de carnes (18), podendo ser encontrados em produtos à base de carne de porco, como o fiambre, o bacon e salsichas do tipo “Frankfurt” (3). A utilização destes compostos permanece como o método mais eficaz na redução do crescimento bacteriano e na eliminação de esporos (18).

3. Vias de exposição

Como já foi referido anteriormente, estes compostos inorgânicos podem ser encontrados um pouco por todo o meio ambiente, nomeadamente no ar, no solo, na água e nos alimentos, podendo também ser produzidos de forma natural no corpo humano (9). A contaminação da água e dos solos com fertilizantes azotados constitui uma grande fonte de exposição a nitratos e nitritos (35).

3.1. Alimentos

Os vegetais, a água e os produtos cárneos curados constituem as principais fontes de exposição aos nitratos (2, 9, 11, 13), sendo os primeiros considerados a principal via de exposição por ingestão (10, 13, 49), não obstante a diversidade existente entre os hábitos alimentares e a qualidade da água disponível para consumo humano a nível mundial (13).

Alguns estudos estimam que os vegetais contribuem com cerca de 70 a 90% da ingestão total de nitratos (14, 50), enquanto outras fontes apontam para níveis de exposição de cerca de 80 a 94% (2). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a ingestão de vegetais contribui com cerca de 30 a 90% do aporte diário de nitratos, sendo o valor mais elevado, correspondente a valores registados em países europeus (51).

Segundo um parecer da autoria da Comissão Europeia (CE), o consumo médio de nitrato varia entre 52 e 156 mg/dia, em vários países europeus. Indivíduos com dieta vegetariana tendem a apresentar valores de ingestão superiores, sendo o consumo médio no Reino Unido de cerca de 185 a 195 mg/dia, um valor cerca de quatro vezes superior à média nacional (10, 14).

A ingestão média diária de nitritos é geralmente inferior a 2 mg por pessoa, embora a formação endógena destes compostos possa aumentar os níveis de exposição e eventualmente exceder o valor de ADI estabelecido (10).

Como seria de esperar, os níveis de nitratos em diferentes tipos de produtos hortofrutícolas são bastante díspares, sendo que os frutos apresentam os teores mais reduzidos (10). Alguns estudos afirmam que os valores podem variar entre 30 e 6000 mg/kg (3, 52), outros ainda referem que o valor mínimo pode chegar aos 4 mg/kg (53).

O anexo A apresenta uma classificação onde constam os vegetais agrupados de acordo com o seu teor em nitratos, proposta por alguns autores e entidades. De uma forma geral, os vegetais que apresentam maior capacidade de acumulação de nitratos e, em consequência, maior teor de nitratos na sua composição, pertencem às famílias *Amaranthaceae* (beterraba, acelga e espinafre), *Asteraceae* (alface) e *Brassicaceae* (rabanete, rúcula, agrião, couve-chinesa), embora esta última, por englobar uma variedade tão extensa de organismos, inclua também vegetais com níveis reduzidos de nitratos. As famílias *Fabaceae* (feijão, ervilha, fava) e *Solanaceae* (batata, tomate, pimento, beringela) são algumas das famílias que apresentam os níveis mais baixos de nitratos (9-11).

Nas plantas, os nitratos estão presentes principalmente nos vacúolos celulares e são transportados através do xilema, tecido responsável pelo transporte de água e nutrientes da raiz até às folhas. Isto significa que os vegetais folhosos como a alface e o espinafre irão apresentar concentrações relativamente mais elevadas destes compostos, enquanto órgãos de armazenamento como a batata, a cenoura, o alho-francês, a cebola, as sementes e as vagens de ervilhas e plantas de feijão apresentam concentrações relativamente mais baixas (11). Também em consequência do sistema de transporte das plantas, as folhas mais jovens tendem a apresentar menor concentração de nitratos do que as folhas mais antigas (11).

Os vegetais de folha verde são os que apresentam níveis mais elevados de nitratos (11, 15), com valores de concentração acima de 1000 mg/kg, ou até mesmo de 2500 mg/kg (3, 9, 10).

A concentração média de nitritos em vegetais é geralmente inferior a 2 mg/kg (3, 54). Os vegetais contribuem apenas com cerca de 2 a 6% da ingestão diária total de nitritos (11). Ao contrário do que acontece com os nitratos, a exposição aos nitritos dá-se maioritariamente por via endógena, através da oxidação do óxido nítrico e da redução dos nitratos por bactérias comensais na boca e no trato gastrointestinal. A redução do nitrato que ocorre na cavidade oral representa a fonte mais importante de nitrito para o ser humano, responsável por cerca de 70-80% da exposição total a estes compostos, sendo o restante proveniente diretamente de alimentos como carnes processadas, fruta e legumes (2, 11, 50).

3.2. Água

A utilização de nitratos na agricultura, sob a forma de fertilizantes azotados, tem sido a principal fonte de poluição das águas na Europa (55). A agricultura é referida como a atividade responsável por mais de 50% das descargas totais de azoto nas águas superficiais da União Europeia (55).

A contaminação das plantas e do solo, associada à elevada solubilidade e mobilidade que estes compostos apresentam, conduz, através de processos de degradação e/ou lixiviação, à contaminação das águas superficiais e dos lençóis freáticos (2, 3, 5, 6).

As principais fontes de poluição difusas são o escoamento de resíduos agrícolas e a incorporação de azoto atmosférico (3). A concentração de nitritos no meio ambiente, e mais especificamente na água, é normalmente muito baixa, mesmo quando a concentração de nitratos é elevada (3).

Os nitratos são uma das principais causas de eutrofização das águas superficiais, que leva a um crescimento abundante de algas e plantas aquáticas. Como tal, a concentração de nitratos nas águas superficiais é geralmente menor do que nas águas subterrâneas (3).

A água potável continua a ser, em alguns casos, apontada como um contributo importante na ingestão total de nitratos. Este facto adquire maior importância no caso de crianças que são alimentadas com fórmulas infantis reconstituídas com água potável (14). Em alguns casos, quando são contabilizados os alimentos e a água potável no cálculo da exposição diária total, esta pode alcançar níveis superiores a 350 mg por pessoa (10).

4. Fatores que influenciam os níveis de nitratos nos vegetais

4.1. Fatores ambientais, agrícolas e genéticos

O teor de nitratos e nitritos presente nos vegetais pode ser alvo de grandes variações. A mesma espécie vegetal, e até mesmo diferentes partes do mesmo vegetal, apresentam grandes variações na capacidade de acumulação de nitratos (10, 13). A distribuição não homogênea desses compostos no produto é uma consequência da distribuição aleatória das enzimas *nitrato redutase* e *nitrito redutase* no tecido vegetal (13). O potencial de acumulação destes compostos é potencialmente afetado por fatores bióticos e abióticos (11, 15).

A concentração de nitratos nos vegetais pode ser influenciada por fatores ambientais, agrícolas e genéticos (9, 11). Os fatores genéticos incluem a diversidade entre espécies e variedades (2). Estão incluídos nos fatores ambientais, a humidade do solo e a

humidade atmosférica, a época do ano, a intensidade e duração da exposição solar, a temperatura, e o fotoperíodo. Os fatores agrícolas incluem o tipo, período e dosagem da fertilização, o tipo de cultura utilizada, a quantidade de água presente no substrato e a utilização de herbicidas (9-11, 14).

Como já foi referido anteriormente, o teor de nitratos difere em função das diferentes partes que constituem uma planta. Os órgãos vegetais podem ser classificados consoante o seu conteúdo característico de nitratos, de acordo com a seguinte ordem decrescente: pecíolo > folha > caule > raiz > inflorescência > tubérculo > bolbo > fruto > semente (9, 56, 57).

De todos os fatores enumerados, a utilização de fertilizantes azotados e as condições de luminosidade são os que apresentam maior influência sobre o conteúdo de nitratos nos produtos hortícolas (9, 11). Na Europa, verifica-se a tendência de se registarem concentrações superiores de nitratos em vegetais presentes em latitudes setentrionais e durante o inverno, devido à baixa intensidade luminosa e ao menor número de horas de luz existentes durante o dia (16). Estas diferenças podem ser explicadas tanto pela maior radiação térmica que se verifica no verão, que induz a redução dos nitratos, como pela maior taxa de crescimento dos vegetais, que coincide com os períodos de temperaturas mais altas (58). Quando a luz é menos intensa, verifica-se uma redução da taxa fotossintética, o que conduz a uma menor taxa de utilização dos nitratos assimilados pelas plantas na formação de aminoácidos e proteínas (2). A disponibilidade de luz também exerce influência no teor de nitratos de vegetais produzidos em condições de estufa (59), o que significa que também deve ser evitada a ausência de luz neste tipo de cultura (11).

A produção de produtos hortícolas em estufa, ou seja, num ambiente com intensidade luminosa potencialmente reduzida, resulta, na maioria dos casos, num aumento dos níveis de nitrato, independentemente da estação do ano (10, 11, 14).

Os nitratos movem-se do solo até à raiz, principalmente por convecção, o que significa que a escassez de água irá restringir a absorção destes compostos (10, 11). A utilização de alguns tipos de herbicidas pode levar a um aumento do teor de nitratos (10). Os vegetais cultivados em agricultura biológica tendem a apresentar menores teores de nitratos (17).

4.2. Armazenamento e processamento dos alimentos

Os níveis de nitratos e nitritos encontrados em produtos hortícolas podem ainda ser influenciados por fatores como a duração e as condições de armazenamento (armazenamento à temperatura ambiente, em refrigeração ou em congelação) e os tipos de processamento aplicados aos alimentos (lavar, descascar, escaldar ou ferver) (11).

Alguns estudos indicam que o armazenamento de vegetais crus, à temperatura ambiente, resulta na diminuição do teor de nitratos (11). Pelo contrário, os níveis de nitritos presentes em vegetais frescos sofrem um aumento (11), que se torna mais acentuado quando os alimentos são armazenados num ambiente com temperaturas mais elevadas, devido à redução dos nitratos a nitritos (10).

Um estudo realizado em espinafre e couve-chinesa demonstrou que os níveis de nitratos diminuíram significativamente após o terceiro dia de armazenamento à temperatura ambiente, enquanto os níveis de nitritos aumentaram drasticamente a partir do quarto dia de armazenamento sob as mesmas condições. Pelo contrário, o armazenamento em condições de refrigeração (5°C) não originou alterações significativas nos níveis de nitratos ou de nitritos nos mesmos vegetais, após um período de sete dias (60). Este fenómeno sugere que ocorre inativação da enzima *nitrito reductase* durante o armazenamento em condições de refrigeração (11).

Os efeitos do armazenamento em condições de congelação não são ainda totalmente claros e consensuais. Alguns estudos demonstraram que o armazenamento nestas condições inibe a acumulação de nitritos, embora não exerça alterações significativas no teor de nitratos (11), enquanto outros evidenciaram que a congelação diminui os níveis destes últimos (10). Um estudo destinado a avaliar o teor em nitratos e nitritos em brócolos frescos e congelados, concluiu que o teor de nitritos encontrado em vegetais congelados é superior ao descoberto nos vegetais adquiridos frescos, possivelmente devido à presença de uma quantidade elevada de água de processamento nos produtos congelados (61).

Os nitratos são compostos solúveis em água, e como tal, o processo de lavagem pode reduzir o seu teor, especialmente em produtos hortícolas de folha, onde a percentagem de redução de nitratos pode alcançar os 10-15% (11).

Alguns estudos concluíram que os níveis de nitratos podem ser reduzidos em cerca de 18 a 50% (13, 62, 63) e os níveis de nitritos em cerca de 25 a 75%, após algum tipo de processamento preliminar à confeção (lavagem, descasque, corte e enxaguamento) (62). Após terem sido escaldados, o teor de nitratos em alguns vegetais diminuiu mais 30% (10, 63).

A confeção de produtos vegetais, de um modo geral, tem a capacidade de reduzir o teor de nitratos total em cerca de 22 a 79% (13, 22, 61, 64, 65). Alguns autores afirmam que a ebulição é responsável pela redução de cerca de 47-56% dos níveis de nitratos (66, 67), e que tal acontece devido à libertação da quantidade desses compostos que estariam armazenados nos vacúolos (22). Os nitratos são libertados para o líquido que envolve os vegetais durante a ebulição, sendo a extensão da redução do seu teor dependente da quantidade de água utilizada na confeção (10).

5. Mecanismo de ação dos nitratos e nitritos

O nitrato ingerido é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal superior (18-20). Posteriormente, passa do sistema gastrointestinal para a circulação geral (3, 21), através da qual é amplamente distribuído no organismo (18). A concentração plasmática máxima é atingida em cerca de uma hora, com um tempo de meia-vida de cerca de cinco horas (3, 21).

Cerca de 5% dos nitratos ingeridos são reduzidos a nitritos ao nível da cavidade oral, por bactérias saprófitas da língua (3, 10, 22, 68-70), e ao nível do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis (71, 72). Em crianças e indivíduos com quadros de gastroenterite, a taxa de redução pode ser consideravelmente superior, devido ao valor superior de pH gástrico (11). Os nitritos formados passam posteriormente para o estômago (3).

No estômago, os nitritos, em condições de pH ácido, podem ser convertidos em óxido nítrico (NO) (3, 18) ou em agentes de nitrosação que, por sua vez, vão reagir com aminas secundárias ou alquilamidas, através de reações de nitrosação (nitrosação endógena), em que se formam os compostos do tipo N-nitroso (nitrosaminas e nitrosamidas), sendo alguns destes compostos reconhecidamente carcinogénicos (2, 13, 19). Estas reações de nitrosação podem, em alguns casos, ser inibidas na presença de ácido ascórbico ou outros antioxidantes (agentes redutores) (3).

Cerca de 65-70% do nitrato é excretado na urina nas 24 horas seguintes, e menos de 1% é excretado nas fezes (18-20).

Embora a maioria do nitrato presente no organismo surja a partir da sua ingestão, este também pode ser sintetizado endogenamente (73). Este fenómeno ocorre principalmente através da via L-arginina – NO, pela produção de NO a partir do

aminoácido L-arginina e de oxigénio molecular, através da enzima *óxido nítrico sintetase* (NOS), seguida da sua conversão final a nitrato (11, 18, 73, 74).

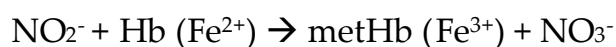
6. Toxicidade dos nitratos e nitritos

Os nitratos não são, por si só, tóxicos, resultando a sua toxicidade dos seus metabolitos e produtos de reação, como os nitritos e as N-nitrosaminas, entre outros compostos N-nitroso (2, 3, 11) que são tóxicos e carcinogénicos (11, 33).

6.1. Metahemoglobinémia infantil

Um dos principais efeitos adversos dos nitratos para a saúde humana é a metahemoglobinémia infantil (34), doença frequentemente designada como o “síndrome do bebé azul” (9). Os primeiros casos de ocorrência de metahemoglobinémia em crianças após exposição a elevados níveis de nitratos através da ingestão de água foram descritos nos anos 40 (75).

Esta patologia ocorre quando, no sangue, os nitritos oxidam a hemoglobina (Hb), formando-se a metahemoglobina (metHb), que deixa de estar funcional na atividade de transporte do oxigénio para os tecidos (3). Durante a formação da metHb, o ferro presente na Hb passa do seu estado ferroso (Fe^{2+}), ao estado férrico (Fe^{3+}), em resultado da sua oxidação, com consequente produção de nitratos (equação 1) (3, 35, 37):



Equação 1 – Fórmula da reação dos nitritos com a hemoglobina (adaptado) (3)

Quando a proporção de metHb atinge cerca de 20% face aos níveis normais de Hb, começam a ser visíveis sintomas clínicos como cianose, fraqueza, aumento da frequência cardíaca e hipoxia. A depressão do sistema nervoso central pode ainda ser traduzida por cefaleias, tonturas, fadiga e náuseas. Em casos mais severos podem ocorrer convulsões, coma e morte por asfixia (2, 35-38).

Esta condição tem sido observada principalmente em crianças com menos de 6 meses de idade, sendo particularmente crítica em lactentes com menos de 3 meses (3, 75, 76). A maior suscetibilidade dos bebés relaciona-se com o fato destes (a) possuírem ainda uma elevada percentagem de hemoglobina fetal (cerca de 60 a 80% em bebés com menos de 3 meses e 20-30% aos 3 meses de idade) que é mais facilmente oxidada a metHb, (b) o seu sistema enzimático não estar completamente desenvolvido, não possuindo assim capacidade de reduzir a metHb novamente em Hb, (c) apresentarem um pH gástrico elevado, que origina uma maior redução do nitrato a nitrito pelas bactérias gástricas, (d) ingerirem uma grande quantidade de líquidos em relação ao seu peso corporal (cerca de 3 vezes mais que num adulto), potencialmente prejudicial no caso de ingestão de água contaminada com nitratos (3, 22, 35, 38).

Os outros grupos de risco são as grávidas e indivíduos com acidez gástrica diminuída ou com deficiência hereditária na enzima *metahemoglobina redutase* (35).

6.2. Carcinogenicidade

A IARC (International Agency for Research on Cancer) classificou os nitratos e nitritos provenientes da dieta como prováveis agentes carcinogénicos para os humanos (Grupo 2), em condições que possibilitem as reações de nitrosação endógena (3).

Estudos experimentais em animais demonstraram que as nitrosaminas são potentes carcinogénicos, causando maioritariamente tumores hepáticos, assim como tumores nos rins, nos pulmões e na cavidade nasal. Esta carcinogenicidade evidente em animais sugere a ação potencialmente carcinogénica para o ser humano (14, 77).

A monografia da IARC conclui, através de estudos realizados em humanos, que não é possível atribuir uma correlação entre a ingestão de nitratos e cancro do estômago ou do esófago, sendo que, em alguns casos, se verificou uma correlação inversa, que pode ser atribuída aos nutrientes provenientes do consumo elevado de produtos hortícolas (3). Nenhum dos estudos realizados permitiu observar uma associação positiva entre a ingestão destes compostos e o desenvolvimento de tumores cerebrais, tumores do trato urinário e cancro colo-retal em adultos e crianças (3).

7. Caracterização do perigo

O SCF definiu uma dose diária admissível (ADI) de 3,7 mg/kg peso corporal/dia para os nitratos e 0,06 mg/kg p.c./dia para os nitritos (11, 14). Estes valores de ADI foram calculados com base nos níveis de efeitos não observados (NOEL), determinados experimentalmente através de ensaios de toxicidade crónica e sub-crónica em animais (11). Foi aplicado um fator de segurança de 500 no caso dos nitratos, e de 100 no caso dos nitritos (14, 33).

8. Relação risco *vs* benefício

Apesar dos potenciais riscos que advêm da presença de níveis elevados de nitratos em vegetais, é necessário ter em conta os potenciais efeitos benéficos dos nitratos e dos seus metabolitos, assim como do consumo de vegetais e fruta, para o ser humano (11).

Os nitratos possuem uma longa história no tratamento da doença coronária, sendo já utilizados na China em 700 dC. Em 1880 foi descoberta a importância do ião nítrico no tratamento de doenças cardiovasculares (12, 18), e mais recentemente, enquanto composto com funções antimicrobianas ao nível do trato gastrointestinal, prevenindo algumas patologias como as gastroenterites (11).

O óxido nítrico (NO), produzido a partir do aminoácido L-arginina durante a síntese endógena de nitrato, apresenta funções fisiológicas essenciais, como o controlo da pressão sanguínea e a limitação da adesão e agregação de plaquetas, desempenhando também um papel importante na neurotransmissão ao nível do sistema nervoso periférico (11).

Os vegetais, enquanto ótimas fontes de fibras, vitaminas, oligoelementos e antioxidantes, que atuam como agentes contra doenças crónicas e cancro (11), representam uma fonte natural de nitratos para o organismo, contribuindo para a produção endógena de nitritos e NO, e representando, desta forma, uma fonte alternativa destes compostos com potencial terapêutico e que participam em funções biológicas importantes (78). A importância nutricional e os efeitos benéficos inerentes ao consumo de vegetais será descrito mais pormenorizadamente na secção 3 do capítulo II.

O Painel da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) relativo a contaminantes na cadeia alimentar (painel CONTAM) concluiu que, no geral, as exposições estimadas de nitratos em vegetais não são susceptíveis de provocar riscos

apreciáveis para a saúde e, assim, os efeitos benéficos resultantes do consumo de vegetais e fruta prevalecem sobre os potenciais riscos para a saúde humana associados à exposição a nitratos através dos vegetais. No entanto, o Painel reconheceu que existem circunstâncias ocasionais em que os vegetais constituem uma grande parte da dieta dos indivíduos, e que essas situações devem ser avaliadas caso a caso (11).

CAPÍTULO II

ALIMENTAÇÃO INFANTIL

Uma alimentação saudável e adequada durante a infância é essencial para o normal desenvolvimento e crescimento do indivíduo e para prevenir uma série de problemas de saúde relacionados com a alimentação, como sejam a anemia, o atraso de crescimento, a malnutrição, a obesidade, ou a cárie dentária (23, 25, 28).

O papel da alimentação na infância, e particularmente durante o primeiro ano de vida, é decisivo para a saúde e desenvolvimento físico e psíquico da criança (26).

1. Amamentação

A OMS recomenda o aleitamento materno exclusivo durante o primeiro semestre de vida, período após o qual deve ser introduzida uma alimentação diversificada em simultâneo com o aleitamento materno durante os dois primeiros anos de vida (32, 79-81).

O leite materno é o alimento eleito pelos pediatras pela sua capacidade de assegurar plenamente, durante um certo período, a quantidade e qualidade de nutrientes necessários para as necessidades alimentares da criança (25, 28, 32). À semelhança do recomendado pela OMS, os pediatras aconselham igualmente a amamentação, em exclusivo, até aos 4-6 meses de idade (28), período a partir do qual, o leite materno ou as fórmulas infantis se tornam insuficientes para suprir as necessidades em energia, proteínas e alguns minerais e vitaminas (82, 83).

2. Diversificação alimentar

A diversificação alimentar, também designada como alimentação complementar, consiste na transição de uma alimentação exclusivamente láctea – leite materno ou fórmulas infantis – para outra que inclui, além do leite, outros alimentos semi-sólidos, de textura progressivamente menos homogênea, e alimentos sólidos, introduzidos quando o lactente adquire a capacidade de mastigação (28, 82, 84). A diversificação alimentar durante o primeiro ano de vida é um passo de extrema relevância para o adequado aporte nutricional do lactente e para o seu desenvolvimento físico e psíquico (85). É, portanto, um período intermédio de adaptação entre o aleitamento e a integração na alimentação da família (28, 85).

A OMS, assim como outros organismos internacionais interessados em Nutrição Pediátrica, recomendam que a diversificação alimentar não se inicie antes dos 4-6 meses, nem após os 6-8 meses de idade (28). Em 2006, um estudo multicêntrico da OMS realizado em seis países, com crianças até aos dois anos de idade, demonstrou que a idade média de introdução da diversificação alimentar é de 5,4 meses (86).

Atualmente e apesar das várias recomendações feitas pela OMS, é muito comum, a ausência de aleitamento materno ou a sua interrupção precoce (83), assim como a introdução de outros alimentos na dieta do lactente antes dos seis, ou mesmo dos quatro meses de idade (83, 87).

2.1. Ordem de introdução de novos alimentos

A cronologia de introdução de novos alimentos não deve ser rígida e deve ter em consideração uma série de fatores de ordem social e cultural, tais como os costumes de cada região, questões socioeconómicas, disponibilidade e hábitos do agregado

familiar, disponibilidade local de determinados alimentos, e particularidades do lactente (como alergias alimentares, patologias específicas, *etc.*) (28, 82, 88).

Habitualmente, os primeiros alimentos a serem introduzidos na alimentação dos lactentes são os cereais, sob a forma de farinha láctea ou não láctea. A estes seguem-se normalmente os produtos hortícolas, através de um caldo ou puré de legumes, a fruta, as carnes (com preferência por carnes magras e peixe), e finalmente, os ovos (26, 28, 32, 82, 88).

Os tipos de vegetais introduzidos na alimentação do lactente, assim como a ordem em que esta deve ser feita, é uma temática que se encontra atualmente em discussão, pela crescente sensibilização da comunidade para os potenciais riscos dessa prática, em contrapartida com todos os benefícios reconhecidos da ingestão desses alimentos.

A sopa de legumes representa uma fonte de vitaminas, minerais e fibras, que facilitam a formação do bolo fecal e exercem uma ação favorável sobre o peristaltismo intestinal. Esta deve ser introduzida pouco a pouco, até substituir uma das refeições lácteas. Deve ser iniciada com uma base de cenoura, abóbora e batata, ou arroz (não esquecendo a cebola e o alho), introduzindo progressivamente outros vegetais, embora, um de cada vez. Devem introduzir-se primeiro, preferencialmente, os legumes de cor mais clara, por serem mais tenros, fáceis de digerir e menos alergénicos, como a alface, a couve branca e o alho-francês. As leguminosas devem ser introduzidas apenas após os 10-12 meses de idade (26, 32, 85).

Alguns autores defendem que vegetais como a batata, a cenoura, a curgete, os brócolos, a cebola, o alho, o alho-francês, a alface e a couve branca, são os mais indicados para comporem as primeiras sopas de legumes. Pelo seu conhecido elevado teor de nitratos e de fitatos, a introdução de legumes como os espinafres, o nabo, a nabiça, a beterraba e o aipo, é apenas aconselhada após os 12 meses de idade (82).

A partir dos 8 meses, deve fazer-se a adaptação progressiva ao regime alimentar da família, e o bebé já poderá fazer uma refeição completa (sopa, prato e fruta) (26, 32).

Apesar do reconhecimento dos potenciais riscos, a importância dos vegetais na alimentação humana e, em especial, na alimentação de lactentes, enquanto um dos primeiros alimentos a serem introduzidos na diversificação alimentar, é já bastante reconhecida entre a comunidade pediátrica e órgãos internacionais competentes em matéria de nutrição infantil. Como tal, as suas características, relevância e efeitos benéficos para a saúde serão descritos na seção 3 deste capítulo.

2.2. Necessidades nutricionais do lactente

As necessidades nutricionais do lactente são elevadas e dependentes da existência ou não de aporte de leite materno na alimentação.

Segundo a OMS e a Pan American Health Organization (PAHO), as necessidades energéticas de crianças entre os 6-8 meses são de 600 Kcal/dia, entre os 9-11 meses são de 700 Kcal/dia, e entre os 12-23 meses são de 900 Kcal/dia. Assim, nos países industrializados, as crianças com um aporte médio de leite materno, necessitam de uma alimentação complementar que contribua com um valor energético de cerca de 130 kcal/dia dos 6 aos 8 meses, 310 kcal/dia dos 9 aos 11 meses e 580 kcal/dia dos 12 aos 23 meses de idade. Em países em desenvolvimento as estimativas diferem ligeiramente: 200, 300 e 550 kcal/dia para crianças com 6-8 meses, 9-11 meses e 12-23 meses, respetivamente (79, 80, 83).

A diversificação alimentar deve ser dividida num determinado número de refeições diárias, que permita uma distribuição correta e saudável dos novos alimentos introduzidos na dieta da criança. A uma criança de porte médio, saudável e em fase de amamentação, devem ser dadas 2 a 3 refeições por dia, dos 6 aos 8 meses e 3 a 4

refeições por dia, dos 9 aos 24 meses de idade, com introdução, a partir dos 12 meses, de alimentos nutritivos adicionais (peça de fruta ou pão), uma a duas vezes por dia, como sobremesa (31, 79, 80).

Para uma criança de porte médio, saudável e que já não seja amamentada, devem ser dadas 4 a 5 refeições por dia, com a introdução dos referidos alimentos adicionais. Nestes casos, as refeições incluem, para além dos típicos alimentos que fazem parte da diversificação alimentar, alimentos à base de leite, e combinações entre estes (81).

2.3. Regime alimentar dos 5 aos 12 meses

As recomendações pediátricas referem, de uma forma geral, que a sopa representa a primeira refeição, substituindo inicialmente uma refeição à base de leite (que inclui a amamentação), por volta dos 5 meses de idade e, um mês depois, duas refeições à base de leite, passando a representar duas refeições diárias. Até aos 12 meses de idade vão sendo acrescentados outros alimentos que complementam a alimentação do lactente, tal como descrito na secção 2.1 do presente capítulo.

As mais reconhecidas marcas de alimentação infantil, como a Nestlé® (89), a Nutribén® (90), a Milupa® (91) e até a Chicco® (92), colocam ao dispor da população inúmeros conselhos e receitas a incluir na alimentação dos bebés no início da diversificação alimentar e até aos 24 meses. Do conjunto de receitas e sugestões, a sopa representa sempre o tema central, em consequência da grande importância que representa na alimentação dos lactentes, permitindo o seu normal crescimento e desenvolvimento.

Em consequência deste padrão, e tendo em conta todos os potenciais efeitos toxicológicos do consumo de nitratos descritos no capítulo anterior, foram confeccionadas e analisadas um conjunto de dezasseis sopas diferentes, tendo em

conta as recomendações e receitas referidas pelas marcas acima mencionadas, e o que sabemos ser a normal composição das sopas de crianças nesta faixa etária.

3. A IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS HORTÍCOLAS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA

Os produtos vegetais fazem parte da dieta humana praticamente desde o início da humanidade, e assumem, ainda nos dias de hoje, um papel importante na dieta da maior parte da população mundial, representando a maior fonte de energia na maior parte dos países em desenvolvimento (27). A importância dos vegetais na alimentação humana é reconhecida há várias décadas, e os efeitos benéficos na nossa saúde têm vindo a ter cada vez maior destaque, numa sociedade cada vez mais marcada pelo crescente número de distúrbios alimentares.

O grupo dos produtos hortícolas compreende uma grande quantidade de produtos vegetais que, botanicamente, podem ser classificados como tubérculos (batatas), raízes e bolbos (cenoura, beterraba, nabo, cebola, alho), caules (espargos), vegetais folhosos (espinafres, agriões, alface, etc.), flores (brócolos), leguminosas ou sementes e frutos hortícolas (abóbora, pepino, tomate, pimento) (11, 26, 27).

Segundo a Nova Roda dos Alimentos (93), criada pela Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto em cooperação com a Direção-Geral de Saúde, o grupo dos produtos hortícolas é o segundo maior grupo de alimentos da roda dos alimentos a seguir ao grupo dos cereais, com um número de porções diárias recomendadas apenas equiparado ao grupo da fruta (3 a 5 porções), embora com valor percentual superior (23%) (figura II.1.) (23, 24).



Figura II.1 – A Nova Roda dos Alimentos (93)

Os hortofrutícolas, ou seja, os frutos, legumes e hortaliças, vulgarmente designados por frutos e vegetais, apresentam uma elevada concentração de nutrientes protetores e reguladores e um baixo valor energético que, aliados à ausência de gordura saturada e de ácidos gordos *trans* e ao baixo teor de sódio, lhes conferem propriedades nutricionais benéficas e o rótulo de alimentos essenciais na prática de hábitos alimentares saudáveis (29, 94, 95).

Os produtos hortícolas são ótimos fornecedores de substâncias biologicamente ativas e são o principal fornecedor de vitamina C, um potente antioxidante com um papel importante na atividade celular, e de carotenóides (principalmente o beta-caroteno) que podem ser convertidos, no corpo humano, em vitamina A, indispensável à visão e à diferenciação celular. São ainda bons fornecedores de minerais (potássio, magnésio, cálcio, zinco, ferro, *etc.*), água, hidratos de carbono, proteínas, vitaminas

hidrossolúveis (niacina, vitamina B6 e ácido fólico), vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina K e vitamina E) e fibras alimentares, que atuam como antioxidantes e protetores (23-28).

Os produtos hortícolas são constituídos por cerca de 80% de água, 1-10% de hidratos de carbono, 1-4% de proteínas e uma quantidade muito pequena de gordura, proporcionando um valor energético entre 10 e 50 calorias por 100 gramas de produto alimentar (26).

A fruta e os vegetais são componentes importantes de uma dieta saudável e, se consumidos diariamente em quantidades suficientes, podem ajudar na prevenção de patologias graves. A OMS e a Food and Agriculture Organization (FAO) recomendam a ingestão mínima de 400 g de fruta e vegetais por dia, correspondendo a 5 porções destes alimentos, para a prevenção de alguns tipos de doenças crónicas como as doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e alguns tipos de cancro, assim como para a prevenção de várias deficiências em micronutrientes, especialmente relevantes em países em desenvolvimento (23, 29, 30). A Associação Portuguesa de Nutricionistas realça alguns benefícios do consumo diário de produtos hortícolas, como a prevenção de vários tipos de cancro, a diminuição da absorção de açúcar e o facto de melhorar o perfil lipídico sanguíneo (23).

A OMS estima que, a nível global, mais de 2,7 milhões de vidas poderiam ser salvas, anualmente, se o consumo de fruta e vegetais fosse suficientemente elevado (29).

Os produtos hortícolas são, portanto, um grupo alimentar de grande importância, e os alimentos que o constituem devem ser ingeridos diariamente. Para além das excelentes características nutricionais referidas anteriormente, os hortícolas podem também servir como laxantes ou anti-diarreicos, consoante o tipo de fibra predominante, sendo, por isso, indispensáveis à normalização e facilitação natural do trânsito intestinal do lactente (31).

Uma dieta pobre em vegetais e fruta, aliadas ao consumo em excesso de proteínas, são erros alimentares que conduzem a uma dieta desequilibrada, com consequências prejudiciais para as crianças, conduzindo, por exemplo, ao desenvolvimento de obesidade infantil (28). Por apresentarem um baixo teor energético, as hortaliças e os tubérculos podem servir de substitutos à papa de cereais, como o primeiro alimento a ser introduzido em lactentes com excesso de peso (31).

3.1. Recomendações de manuseamento e preparação de produtos hortícolas

Existem uma série de cuidados a ter na introdução da diversificação alimentar. Para além das práticas de higiene necessárias na preparação dos alimentos, é necessário aproveitar ao máximo o conteúdo nutricional dos produtos hortícolas através de corretas práticas de preparação e manuseamento. A Direção-Geral de Saúde apresentou algumas precauções a tomar (94):

- Preparar imediatamente os alimentos antes da utilização para que estes não fiquem muito tempo em contacto com o oxigénio, perdendo assim quantidades significativas de vitaminas;
- Cortar, descascar, ripar ou triturar os alimentos imediatamente antes de os servir ou cozinhar;
- Não deixar os alimentos “de molho” (em água) durante longos períodos de tempo;
- Cozinhar os alimentos durante o tempo estritamente necessário e em recipiente fechado, pois a exposição a altas temperaturas reduz o conteúdo em determinadas vitaminas;

Os produtos hortícolas devem ser cuidadosamente lavados para remover a sujidade, agentes microbianos, parasitas, etc. em água corrente e, se necessário, passar por várias águas.

4. Suscetibilidade das crianças aos contaminantes alimentares

Os lactentes e as crianças constituem um grupo populacional particularmente vulnerável aos efeitos da ingestão de contaminantes químicos prejudiciais à saúde humana, o que se deve ao facto de ingerirem uma maior quantidade de alimentos e água face ao seu peso corporal, e ao facto do seu sistema nervoso, imunitário, reprodutivo e digestivo se encontrar ainda em desenvolvimento (96).

Uma alimentação complementar inadequada ou o incumprimento de critérios de controlo microbiológicos e químicos em produtos destinados a lactentes e crianças jovens, podem representar um risco elevado para a saúde e desenvolvimento das crianças, e, em certos casos, provocar danos irreversíveis da sua saúde (96).

De forma a assegurar uma proteção eficaz da saúde dos lactentes e crianças jovens, encontram-se previstos em legislação comunitária os limites específicos para os contaminantes que podem ser encontrados em alimentos destinados à alimentação infantil, nomeadamente no Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro (39), que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, designadamente de nitratos, aflotoxinas, ocratoxina A, patulina, desoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas, chumbo, cádmio, estanho, e benzo(a)pireno, e no Regulamento (UE) N.º 1258/2011 da Comissão, de 2 de Dezembro (40), que altera o anterior documento no que diz respeito aos teores máximos de nitratos nos géneros alimentícios. Os aspetos legais inerentes à presença

de nitratos em géneros alimentícios serão abordados em pormenor do capítulo III deste trabalho.

Os valores de nitratos doseados nos vegetais e nas sopas analisadas serão sujeitos a comparação com o que se encontra definido em legislação comunitária.

CAPÍTULO III

ASPETOS LEGAIS

A exposição a elevados teores de nitratos através da ingestão de água e do consumo de determinados alimentos, e em especial de produtos hortícolas, é já uma realidade considerada por inúmeras entidades e agências com competência em matéria de segurança alimentar, como a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA), a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), a U.S. Food and Drug Administration (FDA) e a Food and Agriculture Organization (FAO). Tendo em conta a repercussão que estes compostos podem ter a nível da saúde pública, os teores de nitratos em vegetais têm sido alvo de regulamentação por parte de organismos envolvidos no processo legislativo.

1. Legislação nacional

A poluição do meio hídrico em Portugal por nitratos de origem agrícola tem sido alvo de uma grande preocupação a nível nacional e europeu.

A Diretiva n.º 91/676/CEE, do Conselho, de 12 de Dezembro de 1991 (97), transposta para o quadro jurídico português pelo Decreto-Lei n.º 235/97, de 3 de Setembro (98), posteriormente alterado pelo Decreto-Lei 68/99, de 11 de Março (99), tem por objetivo impedir ou reduzir a propagação da poluição das massas de água causada ou induzida por nitratos, cuja origem reside na atividade agrícola (100).

2. Legislação comunitária

Segundo o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro (39), que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, os produtos hortícolas, e em especial os vegetais de folha, constituem a principal fonte de ingestão de nitratos para o ser humano, estando por isso estabelecidos neste mesmo diploma os teores máximos para nitratos presentes em determinados produtos hortícolas de folha, como os espinafres e a alface.

Após a aplicação do referido diploma, a Comissão Europeia (CE) concluiu que em alguns casos, e não obstante os progressos registados nas boas práticas agrícolas, não seria possível alcançar, de uma forma coerente, teores de nitratos em alface e espinafres frescos abaixo dos teores máximos legislados (40).

Em resposta a estes factos, a Comissão solicitou à AESA uma avaliação científica dos riscos decorrentes da presença de nitratos nos produtos hortícolas. O Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar adotou, a 10 de Abril de 2008, um parecer científico sobre a presença de nitratos nos produtos hortícolas (11), onde concluiu que, de um modo geral, as exposições estimadas aos nitratos presentes nos produtos hortícolas não são susceptíveis de resultar em riscos consideráveis para a saúde, prevalecendo os reconhecidos efeitos benéficos do consumo desses produtos.

Face às crescentes preocupações acerca dos eventuais riscos para lactentes e crianças jovens de uma exposição aguda a nitratos por via alimentar, a Comissão solicitou à AESA uma declaração científica complementar sobre a presença desses contaminantes nos produtos hortícolas. O painel adotou, em 1 de Dezembro de 2010, uma declaração sobre os eventuais riscos para a saúde de lactentes e crianças jovens decorrentes da presença de nitratos em produtos hortícolas de folha (15), onde concluiu que não é provável que a exposição aos teores máximos de nitratos

previstos no Regulamento (CE) n.º 1881/2006 (39) em espinafres cozinhados a partir de espinafres frescos e em alface suscite preocupações em termos de saúde.

Em conclusão a estes pareceres, a Comissão Europeia considerou conveniente aumentar ligeiramente o teor máximo de nitratos presentes nos espinafres frescos e na alface sem pôr em perigo a saúde pública. Desta medida surgiu então o Regulamento (UE) n.º 1258/2011 da Comissão, de 2 de Dezembro de 2011 (40), que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 (39) no que diz respeito aos teores máximos de nitratos nos géneros alimentícios.

Uma vez que as condições climáticas têm uma grande influência nos níveis de nitratos em certos produtos hortícolas, o regulamento supra citado fixa limites máximos de nitratos em espinafres e alface dependendo da época do ano (tabela III.1). O teor máximo de nitratos em espinafres frescos passa a ser de 3500 mg NO₃/kg, e em espinafres conservados, ultracongelados ou congelados, de 2000 mg NO₃/kg. As alfaces frescas apresentam valores diferentes dependendo do modo de cultivo e da época do ano, sendo que para colheitas de 1 de Outubro a 31 de Março, em estufa e em campo, os valores são de 5000 e 4000 mg NO₃/kg, respetivamente; e para colheitas de 1 de Abril a 30 de Setembro, em estufa e em campo, 4000 e 3000 mg NO₃/kg, respetivamente. As alfaces do tipo “Iceberg” têm valores máximos em estufa e em campo de 2500 e 2000 mg NO₃/kg (40).

Uma vez que as crianças jovens e lactentes constituem um grupo particularmente suscetível aos efeitos adversos dos contaminantes alimentares, foram definidos valores máximos para nitratos em alimentos destinados a esta faixa etária. O valor máximo de nitratos estabelecido para alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens é de 200 mg NO₃/kg.

Tabela III.1. - Teores máximos de nitratos presentes em determinados produtos hortícolas de folha e alimentos destinados à alimentação infantil, de acordo com o Regulamento (UE) n.º 1258/2011 (adaptado) (40).

Género alimentício	Níveis máximos (mg NO ₃ /kg)	
Espinafres frescos (<i>Spinacia oleracea</i>)		3500
Espinafres conservados, ultracongelados ou congelados		2000
Alface fresca (<i>Lactuca sativa</i> L.) (alface cultivada em estufa e do campo), excluindo a alface do tipo “Iceberg” [1]	Colhida de 1 de Outubro a 31 de Março:	
	— Alface cultivada em estufa	5000
	— Alface do campo	4000
	Colhida de 1 de Abril a 30 de Setembro:	
	— Alface cultivada em estufa	4000
	— Alface do campo	3000
Alface do tipo “Iceberg”	— Alface cultivada em estufa	2500
	— Alface do campo	2000
Alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens [2]		200

[1] A menos que a alface cultivada em estufa («alface cultivada em estufa») seja rotulada como tal, são aplicáveis os teores máximos para a alface do campo («alface do campo») (39).

[2] A Diretiva 2006/125/CE da Comissão, de 5 de Dezembro de 2006 apresenta, entre outras, as seguintes definições relevantes (101):

- «Alimentos para bebés», alimentos que não sejam à base de cereais
- «Lactentes», crianças com menos de 12 meses de idade
- «Crianças jovens», crianças com idade compreendida entre 1 e 3 anos

Não existe ainda legislação específica na UE que limite a presença de nitratos nas batatas. No entanto, este alimento contribui em grande medida para o aporte diário de nitratos na dieta devido ao seu elevado consumo (102). Em resultado disto, alguns países restringiram a importação de tubérculos, como por exemplo a Alemanha que proibiu a entrada de batatas com um teor de nitratos superior a 200 mg NO₃/kg, enquanto a Polónia afixou como limite máximo 183 mg NO₃/kg (102).

CAPÍTULO IV

METODOLOGIA ANALÍTICA

1. Generalidades

Os nitratos e nitritos podem ser encontrados no meio ambiente, na composição de seres vivos, e em materiais e matérias-primas utilizados pelo Homem, na sua forma iónica simples ou em outras estruturas moleculares, sendo por isso, um frequente objeto de estudo em diversas áreas. Este facto, aliado à evidência da sua toxicidade para o ser humano, e em especial para bebés e crianças, contribuiu para a necessidade de desenvolver métodos analíticos seletivos e sensíveis para o doseamento destes iões em alimentos.

Existem várias metodologias desenvolvidas e descritas na literatura para a análise destes compostos, nomeadamente a espectrofotometria (8, 103, 104), a análise por injeção em fluxo (Flow Injection Analysis) (FIA) (104-110), a cromatografia líquida de alta eficiência (High-Performance Liquid Chromatography) (HPLC) (110-113), a cromatografia iónica (Ion Chromatography) (IC) (8, 110, 114), a electroforese capilar (Capillary electrophoresis) (CE) (8, 110, 115-120), técnicas eletroquímicas (8, 110) e métodos potenciométricos (8, 110, 121).

2. Métodos de preparação da amostra

Os métodos de preparação da amostra são de extrema importância para a obtenção de resultados precisos e exatos, podendo a sua má execução levar ao comprometimento de todo o processo analítico.

Os procedimentos de extração de nitratos e nitritos, são muitas vezes partilhados pela maior parte dos métodos analíticos. Em geral, a extração da amostra é feita com água quente ou com tetraborato de sódio (bórax) (110), sendo este o método mais usual (122). A este procedimento segue-se, normalmente, a adição de reagentes para precipitação das proteínas e, por fim, a filtração (110). Em amostras vegetais é também utilizada a extração em meio alcalino com adsorção de interferentes com carvão ativado (107). Este método adquire maior importância na análise de nitritos, uma vez que estes podem reagir com outros componentes da matriz caso a extração ocorra em meio ácido (110).

A extração com recurso a água quente demonstrou produzir os melhores resultados (110).

3. Métodos de análise de nitratos e nitritos em alimentos

3.1. Métodos analíticos normalizados

Os métodos analíticos normalizados são métodos de ensaio que seguem determinada norma de ensaio ou documento normativo equivalente. Assume-se que estes métodos foram devidamente validados, estão sujeitos a atualização periódica, e são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional ou internacional. A sua aplicação deve preceder de uma verificação dos parâmetros fundamentais de validação, nas condições de execução e para os fins específicos de cada laboratório, de forma a evidenciar a fiabilidade dos resultados obtidos (123).

A tabela IV.1 apresenta alguns dos métodos analíticos normalizados utilizados na análise de nitratos e nitritos em água para consumo humano (3).

Tabela IV.1 – Métodos analíticos normalizados utilizados na análise de nitratos e nitritos em água para consumo humano.

Método analítico	Limite de detecção mg/L	Limite de quantificação	Referência
HPLC/CD	0,1 (NO ₃); 0,05 (NO ₂)	0,1-50 (mg/L NO ₃); 0,05-20 (mg/L NO ₂)	(124)
IEC/CD	0,002 (NO ₃); 0,004 (NO ₂)	—	(125)
Espectrofotometria (410 nm)	0,1 (NO ₃)	0,1-2 (mg/L NO ₃)	(126)
Espectrofotometria (415 nm)	0,003-0,013 (NO ₃)	> 0,2 (mg/L NO ₃)	(127)
Espectrofotometria (540 nm)	0,001-0,002 (NO ₂)	> 0,25 (mg/L NO ₂)	(128)
Espectrofotometria com FIA (520-560 nm)	—	0,01-1 (mg/L NO ₂); 0,2-20 (mg/L NO ₂ /NO ₃)	(129)
IEC/CSEC	0,003 (NO ₃); 0,004 (NO ₂)	—	(130)
IEC/DCD	0,017 (NO ₃); 0,015 (NO ₂)	—	(131)
CIE (Eletroforese capilar iônica)/detecção UV (254 nm)	0,1	—	(132)
Espectrofotometria (543 nm) (método de redução pelo cádmio)	0,01 (NO ₃ e NO ₂)	0,01-1,0 (mg/L NO ₃)	(133) (*)
IEC	0,5 (NO ₃); 0,4 (NO ₂)	0,3-100 (µg/L)	(134)
IEC/CSEC	0,42 (NO ₃); 0,36 (NO ₂)	—	(135)
CIE/detecção UV (254 nm)	0,08 (NO ₃); 0,1 (NO ₂)	0,1-50 (mg/L)	(136)
Espectrofotometria (540 nm)	0,05 (NO ₃ ou NO ₂)	0,05-1,0 (mg/L N)	(137)
Colorimetria (410 nm)	0,1 (NO ₃)	0,1-2 (mg/L)	(138)

(*) Este método possui várias adaptações, tendo sido apresentada apenas uma delas, a título de exemplo, uma vez que esta matriz não é o objeto de estudo deste trabalho. São exemplos de métodos que podem ser aplicados tendo em conta esta referência: espectrofotometria UV (220 nm), espectrofotometria UV (230-210 nm), análise com eléctrodo de ião nitrato, colorimetria, e colorimetria com FIA (Análise por injeção em fluxo).

A tabela IV.2 apresenta os principais métodos analíticos utilizados na análise de nitratos e nitritos em alimentos, nomeadamente em carne, vegetais e produtos destinados à alimentação infantil (3).

Tabela IV.2 – Métodos analíticos normalizados utilizados na análise de nitratos e nitritos em carnes, vegetais e produtos destinados à alimentação infantil.

Matriz	Método analítico	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Referência
Carne e produtos cárneos	Espectrofotometria ou colorimetria fotoelétrica (538 nm)	—	—	(41)
Carne curada	Colorimetria (540 nm)	—	—	(43), (44)
Produtos cárneos	Espectrometria	—	—	(45)
Produtos cárneos	IEC	—	—	(47)
Fruta, vegetais e produtos derivados	Espectrometria (538 nm)	—	—	(46)
Vegetais e produtos derivados	HPLC/IC	—	—	(48)
Vegetais e alimentos à base destes	Fluxo contínuo (após redução pelo cádmio)	—	—	(139)
Produtos destinados à alimentação infantil (contendo carne)	Espectrofotometria (530 nm)	100-300 mg/kg (NO ₃)	—	(42)
Alimentos à base de vegetais destinados à alimentação infantil	Determinação enzimática	—	—	(140)

3.2. Métodos analíticos descritos na literatura

A espectrofotometria é o método de eleição na determinação de nitratos e nitritos. É amplamente utilizada devido aos excelentes limites de detecção obtidos, à ampla disponibilidade dos instrumentos envolvidos e à simplicidade dos seus protocolos de ensaio (8).

A análise por injeção em fluxo (FIA) é utilizada como método alternativo ao tradicional procedimento colorimétrico de Griess (105). Esta técnica é utilizada na determinação de nitratos e nitritos em vegetais e produtos à base de carne, estando acoplada à detecção espectrofotométrica (104, 106-108). Alguns autores referiram também a aplicabilidade desta técnica na análise de amostras de água e solo (109, 110). As vantagens deste método são a sua simplicidade e o baixo custo do equipamento e dos reagentes (104).

A detecção simultânea de nitratos e nitritos em géneros alimentícios pode também ser feita através da cromatografia iónica, de técnicas eletroquímicas e de eletroforese capilar (CE) (8, 110).

A CE é uma técnica eficaz de separação (8) e as suas principais vantagens são a detecção rápida e simultânea de uma ampla gama de aniões, a simplicidade de instrumentação, a utilização de pequenas quantidades de amostra e o reduzido consumo de soluções-tampão, em comparação com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo assim uma técnica “amiga do ambiente”. Para além disso é um método muito rápido, com um tempo de execução de cerca de cinco minutos, em oposição à espectrofotometria que pode demorar até cerca de uma hora (8, 115-117).

A CE é utilizada na detecção de iões inorgânicos em alimentos destinados ao consumo humano e em alimentos para animais (118, 119), assim como também em amostras vegetais (115). Alguns autores documentaram o sucesso da utilização desta técnica

na análise de nitratos e nitritos em vegetais (115, 116, 118, 120). A detecção de nitratos e nitritos é normalmente realizada por UV a 215 nm (8).

Tal como na análise por espectrofotometria, a determinação de nitratos por CE e por técnicas eletroquímicas envolve, regra geral, o passo de redução destes iões a nitritos, através de uma coluna de cobre/cádmio (Cu/Cd) (8).

A concentração de nitratos em vegetais também pode ser determinada por métodos potenciométricos através da utilização de eléctrodos ião-seletivos (ISEs – Ion-Selective Electrode) (8, 110, 121). Os ISEs apresentam características atrativas enquanto sensores de nitratos, que incluem a facilidade com que podem ser acoplados a sistemas de fluxo contínuo ou a sistemas de fluxo com injeção da amostra, como a FIA, aumentando assim a diversidade das amostras que podem ser analisadas (8). Estes métodos são mais económicos e rápidos comparativamente ao HPLC e FIA, permitindo a análise de uma maior quantidade de amostras vegetais (110, 121).

A análise de nitratos e nitritos envolve, grande maioria das vezes, métodos analíticos capazes de fazerem a pesquisa simultânea destes dois iões. A sua natureza química está intimamente ligada e, como tal, é raramente encontrada uma única espécie química (8).

Os métodos cromatográficos têm sido frequentemente utilizados na análise qualitativa e quantitativa de nitratos e nitritos em alimentos (112). A maior desvantagem destes métodos prende-se com o facto de praticamente todas elas implicarem algum tipo de pré-tratamento da amostra (filtração ou derivatização) (8). Os métodos de cromatografia líquida clássica aliam a simplicidade à versatilidade, sendo vantajosos na análise de nitratos e nitritos em alimentos, em comparação com a cromatografia iónica (IC), devido à sua capacidade de análise de várias substâncias, sendo para isso apenas necessário alterar a coluna. A análise de aniões através deste método não implica a necessidade do equipamento-extra normalmente requerido em

IC (como detetores de condutividade ou supressores), nem uma etapa de pré-tratamento complexa, tornando-se assim a análise mais simples e económica (112).

A IC é frequentemente utilizada na análise de nitratos em vegetais folhosos (114). Um estudo testou três métodos de IC semelhantes ao descrito na Norma Europeia 12014-4 (47) e fez a sua comparação com o método espectrofotométrico, não encontrando diferenças estatisticamente significativas entre ambos (110).

O HPLC com deteção UV tem sido referido por alguns autores na análise de nitratos em amostras de vegetais, produtos lácteos, carnes curadas e cerveja (110). Foi descrito um novo método analítico de HPLC-UV/Visível que possibilita a deteção simultânea de nitratos e nitritos, presentes em concentrações reduzidas, em amostras biológicas e em amostras de vegetais, que se baseia na derivatização dos nitritos numa pré-coluna, utilizando a reação de Griess, e na determinação direta de nitratos através da leitura da absorvência na região do ultra-violeta (111).

Alguns estudos demonstraram que o método de HPLC é fiável na análise de nitratos em vegetais e que pode ser aplicado com êxito em análise de rotina (112, 113). O HPLC em fase reversa tem sido utilizado tanto na análise de água como de alimentos, tendo sido demonstrada a aplicabilidade desta técnica na deteção de nitratos e nitritos em carnes curadas e vegetais (110, 113).

O método colorimétrico, utilizado neste estudo, será descrito com maior detalhe na secção seguinte.

3.2.1. Método colorimétrico: reação de Griess

O método clássico de análise de nitratos e nitritos em alimentos baseia-se na reação de diazotação de Griess (8, 103, 105). Esta reação foi descrita pela primeira vez em 1858 por Johann Peter Griess e deu origem às várias adaptações que hoje podem ser encontradas em áreas como a química, medicina, indústria e ciências forenses (103, 141).

A reação geral de diazotação consiste em transformar uma amina primária num catião diazônio, através da utilização de um agente nitrosante apropriado (142). A reação de Griess inicial baseava-se na reação ocorrida, em meio ácido, entre o ião nitrito (NO_2^-) e o grupo amina do ácido sulfanílico ($\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$), originando um catião diazônio que, ao reagir com a α -naftilamina na posição-*para*, dava origem a um corante azo cor-de-rosa/vermelho (103, 141). Atualmente, o procedimento mais utilizado em análises quantitativas consiste numa adaptação à reação de Griess, que utiliza derivados dos reagentes de Griess iniciais como a sulfanilamida, enquanto amina aromática alvo, e a N-(1-naftil)-etilenodiamina, como acoplador (figura IV.1), sendo a base de muitos métodos espectrofotométricos (105). O produto da reação é geralmente detetado a 540 nm (103, 105), embora este valor varie muito consoante o método adotado. No nosso estudo, os compostos foram detetados a 543 nm.

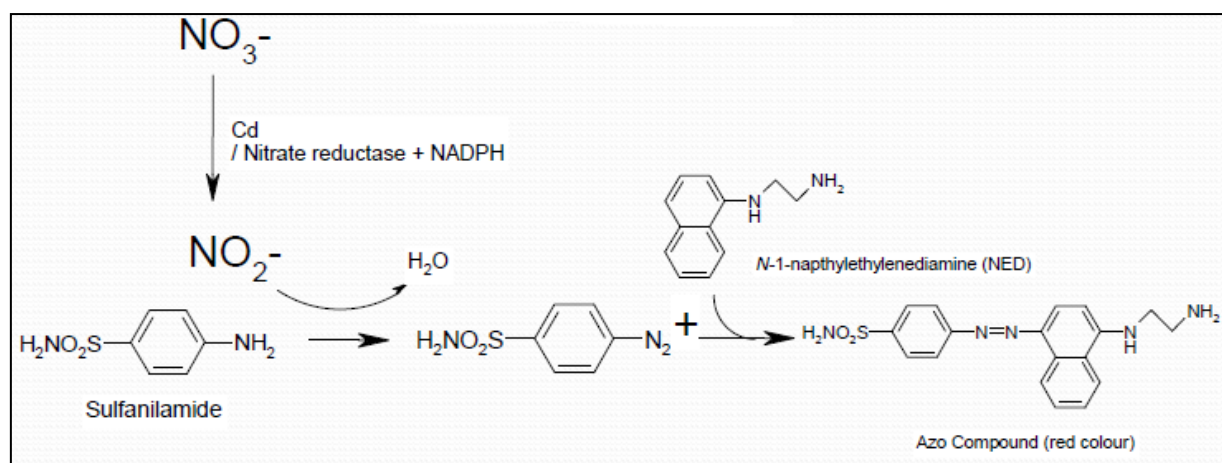


Figura IV.1 – Reação de diazotação de Griess (adaptada) (108)

A reação de Griess é específica para nitritos. A análise de nitratos através desta reação requer uma redução química ou enzimática prévia a nitritos (8, 103, 105).

As vantagens da reação de Griess são a sua simplicidade, rapidez, baixo custo e elevada sensibilidade (103).

Quando acoplada ao HPLC, a reação de Griess é utilizada na derivatização e coloração após a passagem pela coluna cromatográfica (103).

3.2.1.1. Processo de redução

O íon nitrato é relativamente inerte, sendo por isso quimicamente reduzido a nitrito, espécie mais reativa, antes do início da sequência de análise (8).

A redução química é feita frequentemente através da utilização de cádmio (Cd) em várias formas (em pó, esponja e colunas ativadas) e de cloreto de vanádio III (VCl_3) (103).

A utilização de colunas de cádmio na redução de nitratos a nitritos foi documentada na análise de carnes curadas, queijo, produtos destinados à alimentação infantil, fruta e vegetais (110). Os limites de deteção para nitratos e nitritos por métodos de redução são geralmente cerca de 1 mg/kg (110).

No entanto, o cádmio é um metal com propriedades tóxicas e carcinogénicas, e por isso têm sido introduzidas técnicas de redução e agentes redutores alternativos, como o tratamento químico com VCl_3 em amostras de alimentos destinados à alimentação infantil, redução microbiana com *E. coli* em plantas, redução enzimática em carne (110), zinco (143), e hidrazina (144). As colunas de cádmio cobrizado são a modalidade mais comum, com valores de conversão de nitrato a nitrito próximos de 100% (8).

4. Método analítico utilizado

Neste trabalho foi utilizado um método de ensaio adaptado da Norma Europeia EN 12014-2:1997 (48) para a análise de vegetais e alimentos à base destes, destinados à alimentação infantil, onde foi substituído o procedimento cromatográfico por um método de espectrofotometria UV/visível após aplicação da reação de Griess. Este método será descrito no capítulo seguinte (capítulo V – Parte experimental).

5. Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é um aspeto crucial na garantia da qualidade analítica e uma etapa indispensável em qualquer trabalho de carácter científico.

De acordo com o princípio básico da validação de resultados, “um resultado para ser dado como válido tem de satisfazer os requisitos de qualidade que lhe sejam exigidos” (145).

Segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025 (146), a validação de um método analítico é a “confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são satisfeitos”. Por outras palavras, a validação permite demonstrar que um método de ensaio possui as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida, e que este se adequa à finalidade pretendida.

5.1. Grau de exigibilidade

Todos os métodos internos de ensaio praticados em laboratório exigem a instrução de um processo de validação desses métodos, que inclua todos os registos obtidos. A validação deve ser adaptada a cada caso, sendo progressivamente mais exigente para as situações seguidamente apresentadas (146, 147):

- a) Modificações menores da técnica e/ou do equipamento e/ou do produto relativamente a uma norma (ou documento normativo equivalente) existente;
- b) Modificações maiores da técnica e/ou do equipamento e/ou do produto relativamente a uma norma (ou documento normativo equivalente) existente (as alterações podem suscitar dúvidas quanto à equivalência técnica dos resultados);
- c) Métodos baseados em técnicas de ensaio conhecidas, cuja aplicação ao ensaio pretendido venha descrita em literatura científica não existindo norma de ensaio correspondente;
- d) Métodos de ensaio baseados em técnicas de ensaio conhecidas, mas cuja aplicação ao ensaio pretendido não venha descrita em literatura científica;
- e) Métodos baseados em técnicas de ensaio inovadoras, não descritas na literatura científica.

Depois de avaliado o grau de exigibilidade requerido para um método interno, será necessário realizar alguns estudos de validação antes de o colocar em rotina, durante a sua implementação ou sempre que ocorra uma alteração relevante do mesmo (123).

Os requisitos mínimos para a validação de um método analítico dependem do tipo de metodologia em causa e incluem os seguintes parâmetros: gama de

trabalho/linearidade, limiares analíticos, dos quais fazem parte o limite de detecção e quantificação, sensibilidade, precisão e exatidão (123), embora possam ser incluídos no estudo da validação, outros parâmetros para além dos supra citados.

5.2. Definição dos parâmetros de validação

5.2.1. Avaliação indireta

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação indireta e por avaliação direta. A validação por avaliação indireta implica a determinação parâmetros característicos, podendo estes incluir (123, 148):

- a) Seletividade/Especificidade;
- b) Curvas de calibração;
- c) Linearidade/Gama de trabalho;
- d) Limiares analíticos (limites de detecção e quantificação);
- e) Sensibilidade;
- f) Precisão;

5.2.1.1. Seletividade/Especificidade

As definições apresentadas para estes conceitos são, na maior parte das vezes, muito semelhantes, chegando mesmo a ser utilizados em simultâneo e em complementaridade.

A seletividade e/ou especificidade é um parâmetro que caracteriza a forma como os resultados podem ser afetados por outros componentes da amostra para além do analito, ou seja, a capacidade de um método para identificar e distinguir, de forma precisa e específica, o analito-alvo de interesse na presença de componentes numa

matriz complexa (123, 149). A Association of Official Analytical Chemists (AOAC) define o termo especificidade como “a capacidade de um método para medir apenas o que se pretende medir” (149). Estes parâmetros dependem, essencialmente, da técnica utilizada, podendo variar de acordo com o tipo de composto ou matriz (150).

A avaliação da seletividade do método é feita normalmente através da realização de testes de recuperação, que possuem a mesma matriz mas concentrações de analito variadas, ou através de soluções que contêm os interferentes mais prováveis para a amostra em questão (123, 149). No caso de se desconhecerem as soluções interferentes, a avaliação da seletividade pode ser feita através da comparação dos resultados obtidos com outras técnicas (149).

Um método analítico pode ser considerado aplicável (específico e seletivo) quando se verificarem taxas de recuperação próximas de 100%. No entanto, o êxito das taxas de recuperação depende do tipo de metodologia praticada, podendo admitir-se intervalos de recuperação mais alargados para alguns métodos com características que o justifiquem (123).

5.2.1.2. Curvas de calibração: linearidade e gama de trabalho

A calibração representa um processo no qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou quantidade de substância conhecida (123).

A calibração analítica do equipamento implica a elaboração de uma curva de calibração, definida pela AOAC como “uma representação gráfica do sinal medido em função da quantidade de analito” (149) e processa-se geralmente do seguinte modo (123):

- a) Preparação de uma série de soluções padrão em que a concentração do parâmetro a dosear é conhecida;
- b) As soluções padrão de calibração são analisadas nas mesmas condições das amostras em estudo;
- c) Estabelece-se um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) e determina-se a concentração do parâmetro nas amostras, por interpolação.

A Norma ISO 8566-1:1990 (151) é uma referência para calibrações analíticas, nomeadamente na aplicação do método dos mínimos quadrados para regressões lineares. De acordo com o mesmo, o eixo vertical (eixo y) representa sempre a resposta instrumental do equipamento, enquanto o eixo horizontal (eixo x) representa sempre as concentrações dos padrões, uma vez que se assume que os erros associados aos valores de x são desprezáveis face aos de y (123).

Quando a curva de calibração representa uma função polinomial do primeiro grau, isto é, uma reta, e caso se utilize o método dos mínimos quadrados para as regressões lineares, pressupõe-se que os erros têm uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias ao longo da reta (123).

A linearidade de um método analítico representa a capacidade de obtenção de resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo. A escala linear corresponde, assim, à gama de concentrações em que o método é capaz de produzir resultados proporcionais à concentração do analito-alvo (148, 149).

De acordo com a Norma ISO 8466-1:1990 (151), a linearidade pode ser observada através da representação gráfica do sinal instrumental em função da concentração do analito (curva de calibração), ou segundo um modelo estatístico, nomeadamente através de uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (anexo B) (123,

148). A Norma ISO 8266-1:1990 (151) recomenda uma reta de calibração com um número de dez padrões, não devendo ser inferior a cinco, que devem ser distribuídos uniformemente no intervalo de trabalho (123).

A linearidade pode também ser estimada com recurso ao coeficiente de correlação linear (R) (148) e ao coeficiente de determinação (R^2) (152), embora não devam ser utilizados isoladamente, já que são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade (123). Devem por isso ser efetuados outros testes de linearidade, nomeadamente o teste das áreas normalizadas, o teste de análise de resíduos, o teste de RIKILT, e o teste de Fisher/Snedecor ou teste de Mandel, que se encontram descritos nos anexos B, C, D, E e F, respetivamente (123, 153).

A gama de trabalho é definida pelo IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) como o intervalo de valores, no qual o erro instrumental se situa dentro dos limites aceitáveis (149) e para o qual se demonstrou que o procedimento analítico possui um nível adequado de precisão, exatidão e linearidade (153).

Em análises quantitativas, com recurso à elaboração de curvas de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias (Teste F) (anexo G) (123). Se $VT \leq F(N-1, N-1, 99\%)$, então a diferença entre as variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada (123).

O limite mais baixo da gama de trabalho deve ser igual ou superior ao limite de quantificação do método e o limite mais alto será o valor até ao qual a gama de trabalho tenha homogeneidade de variâncias e linearidade (123).

5.2.1.3. *Limiares Analíticos*

Os limiares analíticos de um método de ensaio compreendem o limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ).

O primeiro e o último padrão devem ser analisados em dez réplicas independentes (123).

O LOD é definido como “o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável”, de acordo com a AOAC e o guia 13 da RELACRE (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal) (123, 149). Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato (123).

Quando o método analítico requer a utilização de uma curva de calibração, o limite de deteção é geralmente definido pela expressão (123, 154):

$$LOD = \frac{\left[3 \times S_{y/x} \right]}{b} \quad \text{(equação 2)}$$

Onde:

$S_{y/x}$ representa o desvio padrão residual da curva de calibração, correspondente ao desvio padrão de várias leituras do branco ou da solução com a concentração mais baixa do intervalo de linearidade;

b representa o declive da reta.

O LOQ corresponde à mais pequena concentração medida, a partir da qual é possível a quantificação do analito, com exatidão e precisão aceitáveis. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (123, 149). Caso geral, numa calibração linear, o LOQ é definido pela equação (123):

$$LOQ = \frac{\left[10 \cdot S_{y/x} \right]}{b} \quad \text{(equação 3)}$$

Onde:

$S_{y/x}$ representa o desvio padrão residual da curva de calibração;

b representa o declive da curva de calibração.

5.2.1.4. Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método ou equipamento de distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito (123), ou seja, representa a mudança na resposta do equipamento correspondente a uma alteração do analito (149).

Este parâmetro pode ser definido como o quociente entre o acréscimo do valor lido, ΔL , e a variação da concentração, ΔC , correspondente àquele acréscimo, de acordo com a expressão (123):

$$Sensib. = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad \text{(equação 4)}$$

A sensibilidade é descrita como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração numa determinada zona de concentração. Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa reta de calibração. Se a curva de calibração for definida por uma função quadrática (polinómio de 2º grau do tipo $y=cx^2 + dx + e$), a sensibilidade será dada por $y = 2cx + d$ (123).

5.2.1.5. *Precisão*

A precisão de um método representa o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes, obtidos em condições definidas, e permite avaliar a dispersão dos resultados de testes efetuados sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões (123, 155).

O valor da precisão é normalmente expresso em termos de imprecisão, e calculado sob a forma de desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR %). Um valor elevado de desvio padrão é indicativo de uma menor precisão (149, 155, 156).

A precisão está associada aos erros aleatórios inevitáveis inerentes a cada processo de medição, que não podem ser completamente controlados, não estando relacionada com a proximidade ou não entre o valor experimental obtido e o valor verdadeiro (155, 156). Este parâmetro pode ser expresso em condições de repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia (123), sendo que neste estudo apenas foram realizados estudos intralaboratoriais, ou seja, em condições de repetibilidade e precisão intermédia.

5.2.1.5.1. Repetibilidade

A precisão em condições de repetibilidade expressa o tipo de variabilidade esperada em resultados de ensaios independentes, obtidos com o mesmo método, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, durante um curto espaço de tempo, ou seja, o tipo de variabilidade esperada quando uma amostra é analisada em duplicado (123, 149, 156).

A repetibilidade pode ser avaliada através de ensaios intralaboratoriais, efetuando uma série de medições ($n \geq 10$) sobre uma mesma amostra ou padrão (123). Para tal, calcula-se o limite de repetibilidade (r), segundo a equação (157):

$$r = 2,8 \times S_{ri} \quad (\text{equação 5})$$

Onde,

S_{ri} representa o desvio padrão dos resultados obtidos no ensaio de repetibilidade.

O limite de repetibilidade (r) representa o valor abaixo do qual deve situar-se a diferença absoluta entre dois resultados obtidos em condições de repetibilidade, com uma probabilidade de 95% (149).

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), ou desvio padrão relativo, para cada nível de concentração, expresso em percentagem, é dado por (123):

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} * 100 \quad (\text{equação 6})$$

Onde,

\bar{x} representa a média dos valores medidos em condições de repetibilidade.

A avaliação da repetibilidade pode fazer-se também através da análise de duplicados, ou diferença de duplicados (DD), em percentagem, segundo a expressão (145, 158):

$$DD\% = \frac{D}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{equação 7})$$

Onde,

D representa a diferença entre os valores obtidos na análise de duas réplicas;

\bar{x} representa a concentração média das amostras ou padrões em condições de repetibilidade.

5.2.1.5.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia expressa a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais). Estas podem incluir o analista, o equipamento e o intervalo de tempo, sendo este último normalmente superior ao verificado em condições de repetibilidade (123, 149). Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados, pelo que é aconselhável a sua utilização em laboratório (123). Este parâmetro pode ser definido através do cálculo do limite de precisão intermédia (R_i), à semelhança do que é feito para o cálculo do

limite de repetibilidade (r), de acordo com a equação 5 (seção 5.2.1.5.1 do presente capítulo).

5.2.1.5.3. *Reprodutibilidade*

A reprodutibilidade expressa a precisão de um método em determinadas condições, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra ou amostras idênticas, mas variando as condições de medição, ou seja, em diferentes laboratórios, com diferentes analistas, utilizando equipamentos diferentes e/ou em diferentes épocas (123, 149).

À semelhança da avaliação da precisão em condições de repetibilidade, também neste caso é calculado o limite de reprodutibilidade (R), que representa o valor abaixo do qual deve situar-se a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, para uma probabilidade específica (95%), em condições de reprodutibilidade (123). O limite de reprodutibilidade (R) pode ser calculado segundo a expressão (159):

$$R = 2,8 \times S_{Ri} \quad (\text{equação 8})$$

Onde,

S_{Ri} representa o desvio padrão dos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade.

O cálculo da reprodutibilidade é efetuado para cada nível, separadamente, após eliminação dos valores aberrantes (123).

O coeficiente de variação de reprodutibilidade (CV_R), ou desvio padrão relativo, para cada nível de concentração, expresso em percentagem, é dado por (123):

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (\text{equação 9})$$

Onde,

\bar{x} representa a concentração média das amostras em condições de reprodutibilidade.

5.2.2. Avaliação direta

A avaliação direta centra-se sobretudo no estudo da exatidão dos métodos de ensaio. A exatidão representa o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente aceite (123, 157). O termo exatidão, quando aplicado a um conjunto de resultados de ensaio, envolve uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos (157). A Norma ISO 5725 (155) utiliza os termos “veracidade” e “precisão” na descrição da exatidão de um método. A veracidade representa o grau de concordância entre a média aritmética de um elevado número de resultados de ensaios e o valor de referência aceite, e é normalmente expressa pelo termo “bias” ou enviesamento (160). A precisão já foi definida na secção 5.2.1.5 do presente capítulo.

Para avaliar a exatidão utilizam-se geralmente os seguintes processos:

- Materiais de Referência Certificados (MRC)
- Ensaio Interlaboratoriais
- Testes comparativos
- Ensaio de Recuperação

Uma forma de avaliar a exatidão de um método de ensaio é através do cálculo do erro relativo (Er), expresso em percentagem (%), de acordo com a expressão seguinte (123):

$$Er = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \cdot 100 \quad \text{(equação 10)}$$

Onde,

X_{lab} representa o valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética de valores obtidos);

X_v representa o valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor do material de referência certificado ou do material de referência interno.

O erro relativo exprime a componente dos erros sistemáticos. Cabe ao laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exatidão do método em estudo (123).

Os ensaios de recuperação representam também um parâmetro de validação analítica importante na avaliação da exatidão e precisão, já que permitem estudar o efeito da matriz (presença de interferentes) e podem ser utilizados caso não se encontre disponível um MRC. Estes ensaios realizam-se através da adição de uma fração conhecida de padrão a uma amostra, ou série de amostras (amostras fortificadas), e sua posterior análise, calculando-se assim o valor de recuperação (Rec), em percentagem (%), de acordo com a expressão (123, 149):

$$\text{Rec}(\%) = \frac{C_R V_R - C_A V_A}{C_P V_P} \cdot 100 \quad (\text{equação 11})$$

Onde,

C_R representa a concentração do analito na amostra fortificada;

V_R representa o volume de amostra fortificada;

C_A representa a concentração do analito na amostra não fortificada;

V_A representa o volume de amostra não fortificada;

C_P representa a concentração do padrão de fortificação;

V_P representa o volume do padrão de fortificação.

Devem ser analisados vários níveis de concentração, de forma a cobrir a gama de trabalho e incluir concentrações próximas do limite de quantificação, do centro da gama e do último ponto da curva de calibração (161).

CAPÍTULO V

PARTE EXPERIMENTAL

1. Equipamento e material

1.1. Equipamento

- Aparelho medidor de pH com eléctrodo combinado de vidro e sonda de temperatura, GLP22, Crison
- Balança analítica, modelo AB204-S, Mettler Toledo
- Balança analítica, P1210, Mettler Toledo
- Banho ultrasons 9 L, Selecta
- Banho-Maria, Meimert
- Bomba de vácuo Diaphragm vacuum pump, modelo MZ 2C, VWR
- Espectrofotómetro UV-Visível, Hitachi U-2000
- Estufa, Meimert
- Placa de agitação e aquecimento Cole Parmer 04644 Series Digital Hot Plate/Stimer
- Robô de cozinha, Bimby
- Sistema de obtenção de água desmineralizada, Desmiwater
- Triturador e homogeneizador de alimentos, 1,2,3-Molinox

1.2. Material

Nesta secção é descrito o material específico utilizado no presente estudo, não se apresentando o material de uso corrente de laboratório.

- Células de vidro com percurso ótico de 1 cm
- Filtros de papel de pregas, 15 cm e 24 cm, Fioroni
- Micropipetas de 200 μL e 1000 μL , Gilson
- Colunas cromatográficas de vidro com torneira de teflon, 300 mm \times 20 mm
- Sistema de filtração constituído por kitasato de 1000 mL e Buckner de 170 mm

2. Reagentes

2.1. Reagentes gerais

- Água desmineralizada ($\leq 2 \mu\text{S/cm}$)
- Ácido clorídrico concentrado *p.a.*, HCl 38%
- Acetato de zinco *p.a.*, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
- Ácido acético glacial *p.a.*, CH_3COOH , 100%
- Ácido fosfórico *p.a.*, H_3PO_4 85%
- Ácido sulfúrico concentrado *p.a.*, H_2SO_4 95,5-97%
- Amónia concentrada *p.a.*, NH_4OH
- Cádmio granular *p.a.*, Cd,
- Cloreto de amónio *p.a.*, NH_4Cl
- Cloridrato de N-naftiletenodiamina *p.a.*, $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$

- Hexacianoferrato (II) de potássio *p.a.*, $K_4 Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$
- Hidróxido de sódio *p.a.*, NaOH
- Hidrogenofosfato dipotássio *p.a.*, K_2HPO_4
- Sal sódico do ácido etlenodiaminotetracético *p.a.*, Na-EDTA
- Sulfanilamida *p.a.*, $NH_2C_6H_4SO_2NH_2$
- Sulfato de cobre (II) *p.a.*, $CuSO_4$,

2.2. Padrões

- Solução mãe de Nitratos 1000 mg/L NO_3^- , CertiPUR® Merck
- Solução mãe de Nitritos 1000 mg/L NO_2^- , CertiPUR® Merck
- Solução tampão pH = 7,01 ± 0,01 (25°C), Fisher
- Solução tampão pH = 4,01 ± 0,01 (25°C), Fisher

3. Soluções

3.1 Soluções Gerais

Solução de hidróxido de sódio a 25% (m/m)

Dissolver 25 g de hidróxido de sódio em água desmineralizada, transferir para balão volumétrico de 100 mL e perfazer o volume.

Solução-tampão, pH=9,6 - 9,7

Para um balão graduado de 1000 ml com cerca de 600 mL de água, medir 17 mL de ácido sulfúrico concentrado. Arrefecer à temperatura ambiente e misturar. Adicionar

100 mL de solução de hidróxido de sódio e perfazer o volume com água. Misturar e acertar o pH a 9,6 - 9,7, se necessário.

Solução de hexacianoferrato (II) de potássio (solução de Carrez 1)

Dissolver 150 g de hexacianoferrato (II) de potássio em água, agitar bem e diluir para 1000 mL. Armazenar em frasco de cor âmbar e substituir semanalmente.

Solução de acetato de zinco (solução de Carrez 2)

Dissolver 220 g de acetato de zinco em água, adicionar 30 mL de ácido acético glacial, agitar e diluir para 1000 mL com água desmineralizada.

Reagente de coloração (Reagente de Griess)

A 800 mL de água desmineralizada adicionar 100 mL de ácido fosfórico a 85% e 10 g de sulfanilamida. Após dissolução completa da sulfanilamida, adicionar 1 g de cloridrato de N-naftiletilenodiamina. Dissolver este último composto e perfazer o volume de 1000 mL com água desmineralizada. A solução é estável cerca de um mês quando guardada num frasco de cor âmbar e no frigorífico.

3.2 Soluções de calibração

Solução padrão de ião nitrito, 10 mg/L (NO_2^-)

Diluir 1 mL de solução mãe de nitratos (1000 mg/L NO_2^-) para balão volumétrico de 100 mL com água desmineralizada.

Solução padrão de ião nitrato, 10 mg/L (NO_3^-)

Diluir 1 mL de solução mãe de nitratos (1000 mg/L NO_3^-) para balão volumétrico de 100 mL com água desmineralizada.

3.3 Soluções padrão de controle

As soluções padrão controle são obtidas por diluição da solução mãe de nitratos e são diluições independentes das da preparação das soluções padrão.

Solução padrão controle de ião nitrato, 100 mg/L (NO_3^-)

Diluir 10 mL de solução mãe de nitratos (1000 mg/L NO_3^-) para balão volumétrico de 100 mL com água desmineralizada.

Solução padrão controle de ião nitrato, 10 mg/L (NO_3^-)

Diluir 1 mL de solução mãe de nitratos (1000 mg/L NO_3^-) para balão volumétrico de 100 mL com água desmineralizada.

3.4 Soluções para regeneração das colunas de cádmio

Solução de ácido clorídrico 4M

Diluir 400 mL de HCl a 32% em 600 mL de água desmineralizada.

Solução de sulfato de cobre (II)

Dissolver 20 g de sulfato de cobre (II) em cerca de 800 mL de água desmineralizada e diluir para 1000 mL.

3.5 Soluções de ativação da coluna de cádmio

Devem fazer-se passar estas soluções nas colunas antes de cada utilização para que o cádmio seja ativado.

Solução de cloreto de amônio em EDTA

Dissolver 13 g de cloreto de amônio (NH_4Cl) e 1,7 g de sal sódico do ácido etilenodiamino tetra-acético (Na-EDTA) em 900 mL de água. Ajustar o pH a 8,5 e diluir para 1000 mL.

Solução de nitratos 1 mg/L

Diluir 1 mL de solução padrão de nitratos para 1000 mL com água desmineralizada.

Solução de ativação diluída I

Diluir 300 mL da solução de cloreto de amônio em Na-EDTA para 500 mL com água desmineralizada.

Solução de ativação II

Misturar 250 mL da solução de nitratos 1 mg/L com 750 mL da solução de cloreto de amônio em Na-EDTA.

4. Validação do método de ensaio

4.1. Método colorimétrico direto

No método colorimétrico direto ou método de Griess para a determinação dos nitritos foi avaliada a linearidade do método, de forma a correlacionar os valores de concentração em nitritos, obtidos na curva direta e na curva obtida após redução na coluna de cádmio.

4.1.1. Linearidade

Preparar 14 soluções padrão do ião nitrito com concentrações compreendidas entre 0,04 e 3,80 mg/L. Medir os volumes correspondentes a partir da solução padrão de nitrito (NO_2), 10 mg/L, para balões volumétricos de 50 mL, perfazendo o restante volume com água desmineralizada.

Adicionar ao branco e a cada padrão, 2 mL de reagente de coloração e agitar. Deixar repousar durante um período superior a 10 minutos e inferior a 2 horas. A reação leva ao aparecimento de uma coloração vermelho-púrpura, após a qual é feita a leitura das absorvências a 543 nm contra o branco.

Registrar o valor de absorvência correspondente a cada padrão e traçar a curva de calibração de nitritos (absorvência *vs* concentração).

A partir da curva de calibração efetuar a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (anexo 2), determinando o coeficiente de determinação da reta (R^2) e o coeficiente de variação do método (CV_m).

Para concluir o estudo do intervalo de linearidade, efetuar vários testes estatísticos, nomeadamente o teste das áreas normalizadas (anexo 3), análise de resíduos (anexo 4), teste de RIKILT (anexo 5) e teste de Mandel (teste de Fisher/Snedecor) (anexo 6). Na tabela V.1 apresentam-se os critérios de aceitação internos estabelecidos para a avaliação do intervalo de linearidade. Quando se verificar a desobediência a um destes critérios, a curva de calibração deve ser ajustada (encurtada), com posterior reformulação de todos os testes.

Tabela V.1 – Critérios de aceitação para a definição do intervalo de linearidade.

Parâmetro	Critério de aceitação
Coeficiente de determinação (R^2)	$\geq 0,995$
Coeficiente de variação do método (CV_m)	$\leq 10\%$
Valor do teste de análise de resíduos	$\leq 15\%$
Valor do teste das áreas normalizadas	$\leq 15\%$
Valor do teste de RIKILT	$\leq 10\%$
Teste de Mandel	$VT \leq F(1, N-3, 95\%)$

4.2. Método de redução pelo cádmio sem solução de ativação

4.2.1. Linearidade

Preparar 13 soluções padrão de íon nitrato, com concentrações compreendidas entre 0,05 e 5 mg/L. Os volumes correspondentes a cada padrão são medidos a partir da solução padrão de nitrato (NO_3), 10 mg/L, para balões volumétricos de 50 mL, perfazendo o restante volume com água desmineralizada.

Passar cada padrão de nitratos pelas colunas de cádmio, para que ocorra a redução dos nitratos a nitritos. As soluções são recolhidas em balões volumétricos de 50 mL. Adicionar ao branco e a cada padrão 2 mL de reagente de coloração e agitar. Deixar repousar durante um período superior a 10 minutos e inferior a 2 horas. A reação

leva ao aparecimento de uma coloração vermelho-púrpura, após a qual é feita a leitura das absorvências a 543 nm contra o branco.

Registrar o valor de absorvência correspondente a cada padrão e traçar a curva de calibração de nitratos (absorvência *vs* concentração).

A partir da curva de calibração, efetuar a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (anexo 2), determinando o coeficiente de determinação da reta (R^2) e o coeficiente de variação do método (CV_m).

Para concluir o estudo do intervalo de linearidade, efetuar alguns testes estatísticos, nomeadamente o teste das áreas normalizadas (anexo 3), análise de resíduos (anexo 4), teste de RIKILT (anexo 5) e teste de Mandel (teste de Fisher/Snedecor) (anexo 6). Na tabela V.1, apresentada no ponto 4.1.1 no presente capítulo, constam os critérios de aceitação internos estabelecidos para a avaliação do intervalo de linearidade. Quando se verificar a desobediência a um destes critérios, a curva de calibração deve ser ajustada (encurtada), com posterior reformulação de todos os testes.

A precisão das curvas de calibração representativas do intervalo de linearidade dos nitratos pelo método de redução pelo cádmio foi avaliado através da elaboração de mais 5 curvas de calibração efetuadas em dias independentes (0,3 e 5 mg/L, NO_3^-).

Calcular o desvio padrão relativo (DPR %) associado às leituras de cada nível de concentração da curva (mg/L) e dos respetivos declives, coeficientes de determinação (R^2), coeficientes de variação do método (CV_m) e limiares analíticos (LOD e LOQ).

4.2.2. Correlação entre os valores teóricos e experimentais

Preparar 12 soluções padrão de íão nitrato, com concentrações compreendidas entre 0,05 e 5 mg/L. Os volumes correspondentes a cada padrão são medidos a partir da solução padrão de nitrato (NO_3^-), 10 mg/L, para balões volumétricos de 50 mL, perfazendo o restante volume com água desmineralizada.

Passar cada padrão de nitratos pelas colunas de cádmio, para que ocorra a redução dos nitratos a nitritos. As soluções são recolhidas em balões volumétricos de 50 mL. Adicionar ao branco e a cada padrão 2 mL de reagente de coloração e agitar. Deixar repousar durante um período superior a 10 minutos e inferior a 2 horas. A reação leva ao aparecimento de uma coloração vermelho-púrpura, após a qual é feita a leitura das absorvências a 543 nm contra o branco.

Registar o valor de absorvência correspondente a cada padrão e traçar a curva de calibração de nitratos (absorvência *vs* concentração).

Efetuar a correlação entre os valores da concentração teórica de nitritos (NO_2^- , mg/L) e a concentração obtida a nível experimental após passagem das soluções de nitratos pela coluna de cádmio.

Determinar a recuperação de nitritos para cada nível de concentração e determinar o intervalo de concentrações a partir do qual a recuperação é constante.

4.2.3. Gama de trabalho

Depois de definido o intervalo de linearidade, analisar 10 réplicas da solução padrão de nitrato correspondente à concentração mais baixa do intervalo de linearidade e 10 réplicas da solução padrão de nitrato de concentração mais elevada do intervalo de

linearidade. Determinar o desvio-padrão (S) e a variância (S^2) de todas as leituras referentes a cada nível de concentração.

Avaliar a gama de trabalho pelo teste de homogeneidade de variâncias, de acordo com a norma ISO 8466-1(162) (anexo 7). A gama de trabalho está bem ajustada se $VT \leq F(N-1, N-1, 99\%)$.

4.2.4. Limiares analíticos (LOD e LOQ)

Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) do método devem ser determinados por dois métodos distintos (Secção 5.2.1.3, capítulo IV). Um deles baseia-se no desvio-padrão residual da curva de calibração ($S_{x/y}$) e no declive (b), e o outro em ensaios de repetibilidade, ou seja, na determinação do desvio-padrão das leituras de 10 soluções padrão de nitratos independentes, cuja concentração corresponde ao primeiro nível de concentração do intervalo de linearidade.

4.2.5. Precisão

4.2.5.1. Repetibilidade

Analisar 10 soluções padrão de nitratos de quatro níveis de concentração (baixo, intermédio e elevado): 0,30 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L e 5 mg/L, num total de 30 réplicas. Determinar o desvio-padrão relativo (DPR %) e o limite de repetibilidade (r) para cada nível de concentração.

4.2.5.2. Precisão intermédia

Analisar 10 soluções padrão de nitratos para cada um dos quatro níveis de concentração (0,30 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L e 5 mg/L) distribuídas em séries de trabalho independentes (8 séries de trabalho). Determinar o desvio-padrão relativo (DPR %) e o limite de precisão intermédia (R_i) para cada nível de concentração.

4.2.6. Exatidão

A exatidão do método pode ser avaliada através de estudos de recuperação (estudo do efeito da matriz) e pela análise de soluções controlo.

Efetuar ensaios de recuperação em diferentes matrizes, neste caso, em diversos vegetais. Fortificar a massa (≈ 10 g) de amostra a analisar (sopa ou vegetal) com:

- 0,5 mL de solução padrão de nitrato a 100 mg/L (8,9 mg/kg)
- 0,15 mL de solução padrão de nitrato a 1000 mg/L (27 mg/kg)
- 0,25 mL de solução padrão de nitrato a 1000 mg/L (44 mg/kg)

Seguir o protocolo descrito para a análise das amostras.

Analisar soluções padrão controlo de nitratos a 0,30 mg/L e 5 mg/L, a partir da solução padrão de nitrato (10 mg/L), e determinar o erro relativo (Er %).

4.3. Método de redução pelo cádmio com solução de ativação

4.3.1. Estudo da linearidade

Preparar 10 soluções padrão de ião nitrato, com concentrações compreendidas entre 0,30 e 5 mg/L. Medir os volumes correspondentes a partir da solução padrão de nitrato (NO_3), 10 mg/L, para balões volumétricos de 50 mL, adicionar 10 mL de solução de ativação II a cada padrão e perfazer o volume com água desmineralizada.

Passar cerca de 100 mL de solução de ativação diluída I e 100 mL de solução de ativação II em cada coluna.

Seguir o protocolo descrito em 4.2.1.

4.3.2. Gama de trabalho

Após a ativação das colunas, seguir o protocolo descrito em 4.2.3.

As soluções padrão são preparadas por diluição da solução padrão de nitrato (NO_3), 10 mg/L, para balões volumétricos de 50 mL e adicionar sempre 10 mL de solução de ativação II a cada padrão antes de perfazer o volume com água desmineralizada.

4.3.3. Limiares analíticos (LOD e LOQ)

Após a ativação das colunas, seguir o protocolo descrito em 4.2.4.

As soluções padrão são preparadas por diluição da solução padrão de nitrato (NO_3), 10 mg/L, para balões volumétricos de 50 mL e adicionar sempre 10 mL de solução de ativação II a cada padrão antes de perfazer o volume com água desmineralizada.

4.3.4. Precisão

Analisar 10 soluções padrão de nitratos para o nível de concentração mais baixo (0,30 mg/L NO₃) e para o nível de concentração mais elevado (2 mg/L), distribuídas em series de trabalho independentes (5 séries de trabalho). Determinar o desvio-padrão relativo (DPR %) e o limite de precisão intermédia (R_i) para cada nível de concentração.

A precisão intermédia foi avaliada após a ativação das colunas, seguindo o protocolo descrito em 4.2.5.

As soluções padrão são preparadas por diluição da solução padrão de nitrato (NO₃), 10 mg/L, para balões volumétricos de 50 mL e adicionar sempre 10 mL de solução de ativação II a cada padrão antes de perfazer o volume com água desmineralizada.

4.3.5. Exatidão

Após a ativação das colunas, seguir o protocolo descrito em 4.2.6.

Efetuar ensaios de recuperação em 4 amostras de sopas. Fortificar a massa (≈ 10 g) de amostra a analisar (sopa) com:

— 5 mL de solução padrão de nitrato a 10 mg/L (8,9 mg/kg)

Seguir o protocolo descrito para a análise das amostras.

A todas as diluições adicionar sempre 10 mL de solução de ativação II antes de perfazer o volume com água desmineralizada.

5. Análise das amostras

5.1. Seleção das amostras

Para a análise individual dos vegetais, foram adquiridas 71 amostras, representativas de um total de 25 espécies vegetais diferentes, entre Fevereiro e Setembro de 2013, em supermercados, hipermercados e frutarias da região de Lisboa. Todas as amostras foram adquiridas no seu estado fresco.

Para a preparação e análise de sopas, foram adquiridas amostras representativas de um total de 18 espécies vegetais, em Junho de 2013, em supermercados, hipermercados e frutarias da região de Lisboa. Foram confeccionadas 16 sopas diferentes.

As amostras vegetais foram selecionadas de acordo com a sua prevalência nas refeições de bebés e crianças com uma faixa etária compreendida entre os 4 e os 12 meses de idade. As sopas foram preparadas e confeccionadas tendo em conta a comum confeção caseira e as doses habitualmente utilizadas na alimentação de crianças até aos 12 meses de idade. A composição de cada sopa foi escolhida tendo em conta as recomendações de entidades responsáveis pela comercialização de produtos destinados à alimentação infantil, nomeadamente a Nestlé® (89), a Nutribén® (90) e a Chicco® (92), assentes em propostas de especialistas em nutrição infantil.

As amostras foram adquiridas no estado mais fresco possível e analisadas no próprio dia da compra. Quando isso não foi possível, as amostras foram armazenadas a 5 ± 3 °C e analisadas no prazo de 2 dias, não comprometendo assim as suas características.

5.2. Preparação da amostra

5.2.1. Amostras vegetais

Lavar os vegetais com água de consumo humano e passar por água desmineralizada, de forma a remover animais, partículas de solo ou sujeira que possam estar aderentes à amostra. Quando a amostra é lavada, pode ocorrer a adesão de gotas de água, a qual pode aumentar a massa da amostra em análise, sendo esse aumento proporcional à sua área de superfície. Deste modo, retirar o excesso de água com papel adsorvente, secar o melhor possível. De seguida, cortar a amostra em pedaços, triturando-a com auxílio de uma picadora até obtenção de uma amostra consistente e homogênea.

5.2.2. Sopas

Preparar e confeccionar as sopas de acordo com a normal prática doméstica, com auxílio do robô de cozinha *Bimby*. Homogeneizar bem as sopas após preparação (5 minutos, velocidade 5, 100°C).

Todas as sopas incluem na sua composição uma base, comum a todas, composta por 100 mL de água desmineralizada, uma colher de sopa de azeite (3 g) e uma colher de café de sal (2 g). A base foi analisada em separado. Na composição de todas as sopas fazem ainda parte, 25 g de cebola e um dente de alho (cerca de 5 g).

A tabela V.2 apresenta a composição das sopas confeccionadas para análise de nitratos pelo método de redução pelo cádmio com solução de ativação.

As amostras de sopa foram analisadas em triplicado. De um dos replicados efetuar um duplicado de análise colorimétrica pelo método de Griess após passagem na coluna de cádmio.

5.3. Extração da amostra

Pesar uma porção de aproximadamente 10 g de amostra e transferir para um frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Adicionar cerca de 400 mL de água fervente e colocar em banho de água a ferver durante 15 minutos. Arrefecer até à temperatura ambiente, transferir a solução para um balão volumétrico de 500 mL, perfazendo o volume com água desmineralizada. Agitar bem e filtrar a solução da amostra através de um filtro de papel de filtro com auxílio de uma bomba de vácuo. A massa de amostra inicial pode ser ajustada em função de um maior ou menor teor de nitratos.

5.4. Análise da amostra

Adicionar à amostra tratada (5.3.), 12 mL de solução de acetato de zinco e 12 mL de solução de hexacianoferrato (II) de potássio (reagentes de Carrez), agitando a mistura após cada adição. De seguida, adicionar 40 mL de solução-tampão, agitar cuidadosamente e filtrar com filtro de pregas. É essencial que o filtrado seja límpido, deixando, se necessário, a mistura em repouso algum tempo antes da sua filtração.

Tabela V.2 – Composição das sopas destinadas à alimentação infantil e confeccionadas no laboratório

Sopa	Ingredientes (*)	Quantidade (g)
Sopa de Batata branca	Batata branca	60
Sopa de batata vermelha	Batata vermelha	60
Sopa de cenoura	Batata branca	60
	Cenoura	100
Sopa de abóbora	Batata branca	60
	Abóbora	100
Sopa de courgette	Batata vermelha	60
	Courgette	100
Sopa de alho-francês	Batata branca	60
	Alho-francês	50
Sopa de chuchu	Batata branca	60
	Chuchu	50
Sopa de feijão verde	Batata branca	60
	Feijão verde	100
Sopa de alface-frisada	Batata branca	60
	Alface frisada	60
Sopa de agrião	Batata branca	60
	Agrião	60
Sopa de brócolos	Batata branca	60
	Brócolos	60
Sopa de couve-flor	Batata vermelha	60
	Couve-flor	100
Sopa de espinafre	Batata vermelha	60
	Espinafres	15
Sopa de nabiça	Batata vermelha	60
	Nabiças	25
Sopa de couve coração-de-boi (repolho)	Batata vermelha	60
	Repolho	60
Sopa de legumes	Batata vermelha	60
	Chuchu	10
	Nabo	30
	Abóbora	30
	Courgette	15
	Cenoura	25
	Alho-francês	20

(*) A base das sopas é sempre 100 mL de água desmineralizada, uma colher de sopa de azeite (≈ 3 g), uma colher de café de sal (≈ 2 g), 25 g de cebola e um dente de alho (≈ 5 g).

Tirar uma toma de 50 mL do filtrado e fazê-la passar na coluna de cádmio (coluna cromatográfica com 20 g de cádmio no seu interior) para que se dê a redução dos nitratos a nitritos.

A velocidade de passagem da amostra na coluna deve ser lenta, preferencialmente num gotejar espaçado, até que se recuperem os 50 mL de amostra, já reduzida (50 mL/15 minutos).

Por fim, adicionar ao branco e a cada amostra, 2 mL de reagente de coloração e agitar. Deixar repousar durante um período superior a 10 minutos mas inferior a 2 horas. A reação leva ao aparecimento de uma coloração vermelho-púrpura. Ler as absorvências a 543 nm contra o branco da coluna. Se a concentração em nitratos no vegetal for superior ao intervalo de linearidade do método, diluir a amostra tratada e repetir o ensaio de redução na coluna de cádmio.

O procedimento de ativação das colunas de cádmio, introduzido posteriormente, consiste na passagem de cerca de 100 mL de solução de ativação diluída I e 100 mL de solução de ativação II em cada coluna, para que o cádmio seja reativado, antes do processo de redução das amostras. Neste novo processo, todas as amostras são diluídas. Num balão de 50 mL adicionar 10 mL de solução de ativação II e perfazer o volume com a amostra a analisar. Nos cálculos considerar 40 mL no volume de amostra.

Entre cada passagem de amostra pelas colunas, estas devem ser lavadas com água desmineralizada até a água de lavagem apresentar-se incolor com a adição de reagente de coloração.

5.5. Ensaio em branco

Este ensaio efetua-se simultaneamente com a análise da amostra, procedendo-se como em 5.4, sem adição de qualquer solução e omitindo a amostra (50 mL de água desmineralizada).

5.6. Análise de nitritos

Tirar uma toma de 50 mL do filtrado e proceder à análise de nitritos pelo método de Griess.

5.7. Regeneração das colunas de cádmio

Após algum tempo de utilização, torna-se necessário voltar a reduzir o cádmio para que as colunas retomem a sua eficiência.

Colocar o cádmio num copo grande e adicionar a solução de ácido clorídrico 4M até este estar submerso. Mexer bem com uma vareta de vidro. Remover a solução de ácido clorídrico e adicionar água até o cádmio estar submerso. Mexer bem com a vareta de vidro. Repetir estes passos mais dez vezes, tendo atenção para que a solução de ácido clorídrico seja bem removida de cada vez. Verificar o pH da água de lavagem. Quando estiver neutro adicionar a solução de sulfato de cobre (II) até o cádmio estar submerso. Mexer bem com a vareta de vidro. O cádmio deverá retomar a cor preta e a solução deverá manter a cor azul. Se necessário lavar de novo com a solução de sulfato de cobre. Por fim, lavar com água desmineralizada duas vezes e secar o cádmio (60-80 °C).

5.8. Cálculos

O teor de nitritos na amostra, expresso em miligramas NO_2 por quilograma de amostra, é dado pela seguinte equação:

$$\text{Teor de nitritos (NO}_2^-, \text{mg/kg)} = \frac{A \times F1 \times F2}{m} \quad (\text{equação 12})$$

A teor de nitrito na solução da amostra lida a partir da curva de calibração, em miligramas por litro;

F1 fator de diluição associado ao processo de preparação e análise da solução da amostra descritos em 5.3 e 5.4

F2 fator de diluição associado à toma de ensaio utilizada na redução

m quantidade da amostra, em gramas, utilizada no ensaio

O teor de nitritos na amostra é expresso em mg NO_2 por Quilograma de amostra.

O teor em nitratos é dado pela seguinte equação:

$$\text{Nitratos (NO}_3^-, \text{mg/kg)} = \text{Nitritos (NO}_2^-, \text{mg/kg)} \times 0,742 \quad (\text{equação 13})$$

Os resultados devem apresentar-se com aproximação às décimas.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Validação do método

1.1. Método colorimétrico direto

1.1.1. Estudo da linearidade

A tabela VI.1 apresenta os resultados iniciais dos testes aplicados para avaliação da linearidade do método colorimétrico direto, para a gama de concentrações de 0,04 a 3,80 mg/L.

O intervalo de concentrações apresenta uma boa correlação ($R^2 = 0,998$), no entanto, após a aplicação do teste de Mandel, o valor de teste (VT) apresenta-se superior ao valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor, o que permite concluir que a função de calibração não é linear, devendo por isso a gama de concentrações ser reduzida. Para além disso, o limite de quantificação provisório (0,5 mg/L) é muito superior ao primeiro ponto da curva de calibração (0,04 mg/L) e os restantes testes estatísticos apresentam valores superiores a 15%, confirmando a falta de linearidade entre as concentrações estudadas.

Tabela VI.1 – Intervalo inicial de concentrações em nitritos para a avaliação da linearidade do método colorimétrico direto.

Parâmetro	Resultado
Número de pontos de calibração (N)	14
Intervalo de concentrações (mg/L)	0,04 – 3,80
Equação da reta	$y = 0,7810x + 0,0309$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9983
Coeficiente de variação do método (CV_m , %)	5,32
Teste de análise de resíduos (%)	[-39,0; -3,05]
Teste das áreas normalizadas (%)	[89,9; 118]
Teste de RIKILT (%)	[88,8; 116]
Teste de Mandel, $VT \leq F(1, N-3, 95\%)$	$186 \geq 4,75$
Limite de detecção (LOD), mg/L	0,15
Limite de quantificação (LOQ), mg/L	0,50

Os resultados foram posteriormente tratados de modo a cumprir os critérios de aceitação definidos para cada teste. O intervalo de concentrações da curva de calibração foi reduzido para 0,04 - 1,00 mg/L. A tabela VI.2 apresenta os resultados após aplicação dos critérios de aceitação definidos nos testes de linearidade.

Tabela VI.2 – Intervalo de linearidade dos nitritos pelo método colorimétrico direto.

Parâmetro	Resultado
Número de pontos de calibração (N)	10
Intervalo de concentrações (mg/L)	0,04 – 1,00
Equação da reta	$y = 0,8428x + 0,0059$
Coeficiente de determinação (R^2)	1,0000
Coeficiente de variação do método (CV_m , %)	0,16
Teste de análise de resíduos (%)	[-0,070; -1,18]
Teste das áreas normalizadas (%)	[99,2; 106]
Teste de RIKILT (%)	[97,3; 104]
Teste de Mandel, $VT \leq F(1, N-3, 95\%)$	$-7,68 \leq 5,32$
Limite de detecção (LOD), mg/L	0,005
Limite de quantificação (LOQ), mg/L	0,015

1.2. Método de redução pelo cádmio sem solução de ativação

1.2.1. Estudo da linearidade

A Tabela VI.3 apresenta o intervalo de concentrações estudado para a avaliação da linearidade dos nitratos após aceitação dos critérios de aceitação para os diferentes testes estatísticos efetuados.

Tabela VI.3 - Testes estatísticos representativos do estudo da linearidade dos nitratos pelo método de redução pelo cádmio sem solução de ativação.

Parâmetro	Curva inicial	Intervalo de linearidade
Número de pontos de calibração (N)	13	7
Intervalo de concentrações (NO ₃ ⁻ , mg/L)	0,050 – 5,00	0,4 – 5
Equação da reta	y = 0,1450x + 0,0041	y = 0,1423x + 0,0116
Coeficiente de determinação (R ²)	0,997	0,998
Coeficiente de variação do método (CV _m , %)	6,71	5,55
Teste de análise de resíduos (%)	[-73,45; 15,40]	[-8,95; 5,99]
Teste das áreas normalizadas (%)	[41,49; 118,95]	[99,6; 112]
Teste de RIKILT (%)	[44,2; 126,8]	[97,0; 107]
Teste de Mandel, VT ≤ F (1, N-3, 95%)	3,18 ≤ 4,84	-0,50 ≤ 7,7
LOD, mg/L NO ₃ ⁻	0,27	0,22
LOQ, mg/L NO ₃ ⁻	0,90	0,75

O método é linear no intervalo de concentrações estudado (0,4 – 5 mg/L NO₃⁻), apresentando um bom coeficiente de determinação ($R^2 \geq 0,995$), $CV_m < 10\%$ (5,55 %) e um valor de teste (VT) inferior ao valor tabelado F de Fisher/Snedecor (F (1, N-3,

05%). A análise de resíduos e o teste das áreas normalizadas apresentaram uma variação inferior a 10%. O teste de RIKILT apresentou uma variação inferior a 15%.

Não sendo exequível a realização de uma curva de calibração diária devido à morosidade da técnica, foi realizado um estudo da estabilidade através de um histórico de curvas de calibração, prévio ao início da análise das amostras. A tabela VI.4 apresenta os resultados do estudo de precisão e estabilidade efetuado.

Ao longo do estudo foram efetuadas várias outras curvas de calibração, sempre que necessário.

Tabela VI.4 - Precisão das curvas de calibração representativas do intervalo de linearidade dos nitratos pelo método de redução pelo cádmio.

Padrões da curva de calibração (n=6)			
mg/L	Absorvências		
	Média	DP	DPR (%)
0,30	0,0373	0,0012	3,1
0,40	0,0600	0,0081	13
0,60	0,0980	0,0069	7,1
0,80	0,1260	0,0154	12
1,0	0,1555	0,0188	12
1,4	0,2120	0,0232	11
2,0	0,2903	0,0239	8
3,0	0,4620	0,0454	9,8
4,0	0,5585	0,0262	5
5,0	0,7283	0,0811	11
Parâmetros das curvas de calibração (n=6)			
Declive	0,1450	0,016	11
Ordenada na origem	0,0053	0,0010	-
Coef. Determ. (R^2)	0,9977	0,0013	0,13

CV _m	3,6	0,45	12
LOD (mg/L NO ₃)	0,20	0,025	12
LOQ (mg/L NO ₃)	0,67	0,08	12

A leitura dos vários padrões pelo método colorimétrico da redução do cádmio é precisa, apresentando desvios padrão relativos entre 3,1% e 13%, no intervalo de concentrações estudado.

Os parâmetros da curva são precisos com desvios padrão relativos inferiores ou iguais a 12%.

Os valores médios dos padrões, que foram utilizados no estudo de precisão das curvas de calibração, foram utilizados para elaborar uma curva média (Tabela VI.5).

Tabela VI.5 – Parâmetros da curva de calibração média para a análise de nitratos pelo método de redução pelo cádmio, sem solução de ativação.

Parâmetro	Resultado
Número de pontos de calibração (N)	8
Intervalo de concentrações (mg/L)	0,30 – 5,0
Equação da reta	$y = 0,1448x + 0,0053$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9990
Coeficiente de variação do método (CV _m , %)	2,5
Teste de Mandel, $VT \leq F(1, N-3, 95\%)$	$-1,13 \leq 6,61$
LOD, mg/L	0,14
LOQ, mg/L	0,46

O método é linear no intervalo de concentrações estudado (0,3 – 5 mg/L NO₃⁻), apresentando um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,999$), um ótimo coeficiente

de variação do método ($CV_m < 3\%$) (2,48 %) e um valor de teste (VT) inferior ao valor tabelado F de Fisher/Snedecor (F (1, N-3, 05%)).

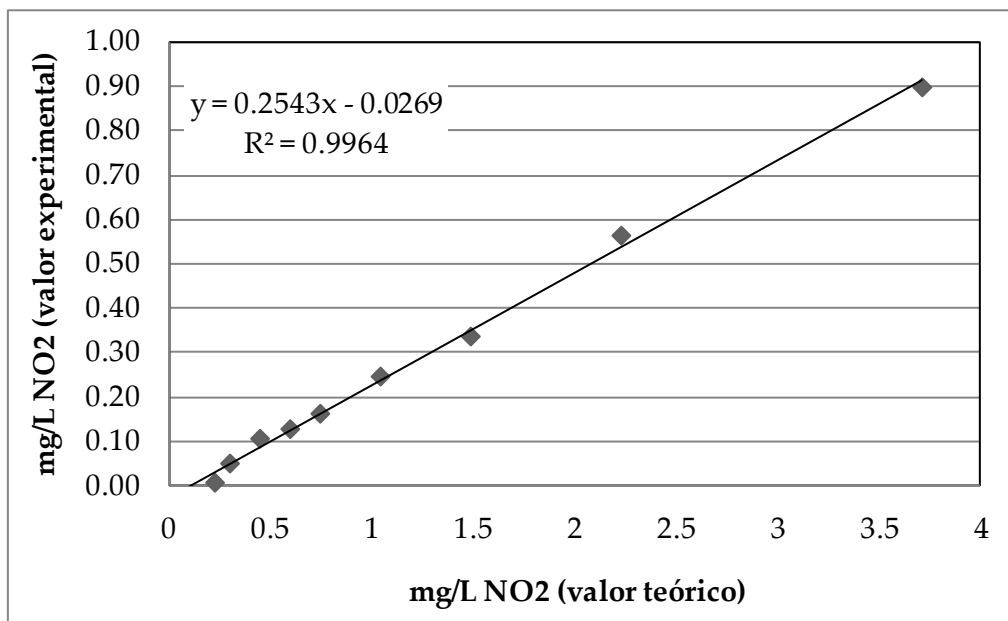
A correlação entre os valores teóricos e experimentais da concentração em nitratos também foram avaliados através da determinação das concentrações de nitritos após passagem das soluções de calibração pela coluna de cádmio e comparação com os respectivos valores teóricos. A Figura VI.1 apresenta os resultados obtidos.

O método apresenta uma boa correlação em ambos os intervalos com $R^2 \geq 0,995$, embora as recuperações sejam diferentes para concentrações inferiores a 0,4 mg/L (Tabela VI.6).

Abaixo de 0,20 mg/L de nitratos, a coluna não consegue reduzir os nitratos de forma a atingir a sensibilidade do método colorimétrico, obtendo-se recuperações muito reduzidas ou mesmo negativas, em virtude dos valores de absorvência serem inferiores ao primeiro ponto da curva de calibração (0,3 mg/L NO_3^-).

A partir de 0,3 mg/L de nitratos, a recuperação média é de 32% com um desvio padrão relativo de 18%.

(A)



(B)

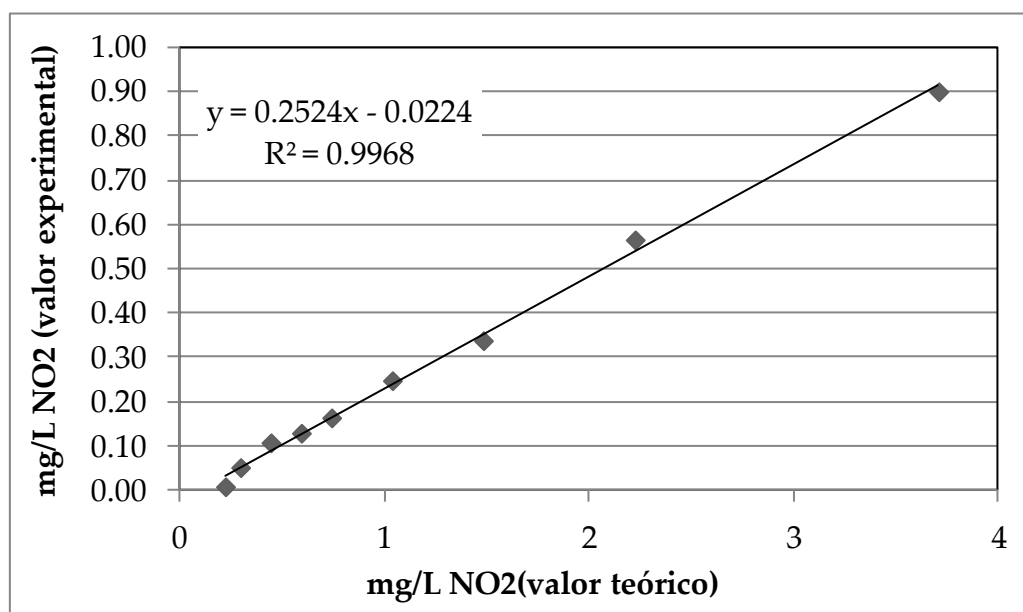


Figura VI.1 - Correlação entre os valores teóricos e experimentais da concentração em nitratos após passagem das soluções de calibração pela coluna de cádmio: (A) Curva de calibração entre 0,050 – 5,00 mg/L, NO_3^- e (B) Curva de calibração correspondente ao intervalo linear do método (0,30 – 5,0 mg/L, NO_3^-)

Tabela VI.6 – Redução de nitratos a nitritos nas colunas de cádmio: percentagens de recuperação dos nitritos.

Concentrações nitratos (mg/L NO ₃)	Concentrações nitritos (mg/L NO ₂)	Recuperações (Rec %)
0,050	0,037	-55
0,10	0,074	5.4
0,20	0,15	20
0,30	0,22	29
0,40	0,30	34
0,60	0,45	34
0,80	0,59	38
1,0	0,74	33
1,4	1,0	40
2,0	1,5	31
3,0	2,2	32
5,0	3,7	25

1.2.2. Gama de trabalho

Após a definição do intervalo de linearidade aplicou-se o teste de homogeneidade de variâncias aos extremos de concentração deste intervalo, nomeadamente aos pontos 0,30 e 5 mg/L. Como $VT \geq F(9;9; 99\%)$, a gama de trabalho não estava bem ajustada. Por esse motivo, foram sido testadas consecutivamente as concentrações superiores, nomeadamente 0,4 mg/L até 1,0 mg/L.

A gama de trabalho do método colorimétrico de redução com coluna de cádmio está compreendida entre 1,0 e 5,0 mg/L NO₃⁻, $VT(5,0) \leq F(5,35)$.

Em rotina, e para os vegetais com concentrações inferiores a 1 mg/L em nitratos, trabalhou-se com o intervalo de linearidade e não com a gama de trabalho.

1.2.3. Limiares analíticos (LOD e LOQ)

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados com base na reta de calibração, tendo em conta o declive e a ordenada na origem, e em condições de repetibilidade. Os resultados obtidos são descritos na tabela VI.7.

Tabela VI.7 – Limiares analíticos do método colorimétrico de redução pelo cádmio, sem solução de ativação.

Limiares analíticos	Reta de calibração	Condições de repetibilidade
LOD (mg/L NO ₃ ⁻)	0,14	0,12
LOQ (mg/L NO ₃ ⁻)	0,46	0,40

Os limites de quantificação determinados a partir da reta de calibração e com base em ensaios de repetibilidade são superiores ao primeiro ponto do intervalo de concentrações, indicando que a gama de trabalho não estaria bem ajustada.

Na análise das amostras serão quantificáveis todos os valores superiores ou iguais a 0,40 mg/L (NO₃⁻), as amostras com concentrações inferiores serão reportadas como < LOQ (0,40 mg/L NO₃⁻).

1.2.4. Precisão

A tabela VI.8 apresenta os resultados obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia, avaliados com base no desvio-padrão relativo (DPR %) de três níveis de concentração e nos limites de repetibilidade (r) e de precisão intermédia (R_I), respetivamente.

Tabela VI.8 – Estudo da precisão do método de redução pelo cádmio, sem solução de ativação, em condições de repetibilidade e precisão intermédia.

Concentração nitratos (mg/L NO_3^-)	Repetibilidade		Precisão intermédia	
	DPR (%)	r	DPR (%)	R_I
0,30	25	0,149	24	0,144
1,0	10,81	0,537	4,8	0,199
2,0	9,9	0,781	1,3	0,105
5,0	12	1,71	12	1,73

O método é preciso em condições de repetibilidade e de precisão intermédia apresentando desvios padrão relativos inferiores ou iguais a 12% para todos os valores superiores ao limite de deteção. Para uma concentração de nitratos igual ao primeiro ponto da curva de calibração, os desvios são muito elevados, uma vez que estamos a trabalhar numa zona inferior ao limite de deteção do método e inferior à respetiva gama de trabalho.

1.2.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de fortificação de várias espécies vegetais ao longo das séries de trabalho. A tabela VI.9 apresenta os resultados das recuperações (Rec %) médias obtidas para cada matriz.

Tabela VI.9 - Estudos de recuperação de nitratos em várias matrizes alimentares (vegetais) para o método de redução pelo cádmio sem solução de ativação (método de Griess).

Vegetal	Nível Fortificação (mg/kg)	Replicas (n)	Rec (%)
Abóbora	44	3	94
Alface frisada	44	6	109
	8,9	1	106
Batata vermelha	26	1	113
Cenoura	8,9	1	72
	27		112
	44		92
Courgette	44	1	113
Couve-lombarda	8,9	1	93
Couve portuguesa	8,9	1	89
Feijão-verde	44	3	120

As amostras de abóbora, alface frisada e feijão-verde apresentam desvio padrão relativos de 7,4%, 15% e 14%, respetivamente.

A recuperação média das várias amostras vegetais foi de 101% com um desvio padrão relativo de 15%, mostrando que o método é exato para as amostras em análise.

A exatidão do método foi também avaliada através da análise de soluções padrão controlo de nitratos de 0,30 mg/L (n=3) e 5 mg/L (n=6) e posterior determinação do erro relativo associado (Er %).

O erro associado às soluções controlo de 0,30 e 5 mg/L NO_3^- variaram entre 3,9% e 21% e entre 2,4% e 13%, respetivamente. O erro relativo médio foi de 9,5% e 7,5%, para as soluções controlo de 0,30 e 5 mg/L, respetivamente. O controlo de 0,3 mg/L apresenta erros superiores e indica que em trabalhos futuros teremos de aumentar a concentração do primeiro ponto da curva de calibração.

1.3. Método de redução pelo cádmio com solução de ativação

1.3.1. Estudo da linearidade

A tabela VI.10 apresenta os resultados iniciais dos testes aplicados para avaliação da linearidade do método de redução pelo cádmio com adição das soluções de ativação, para a gama de concentrações de 0,30 a 5 mg/L.

O intervalo de concentrações está visivelmente desajustado, apresentando um coeficiente de determinação e um coeficiente de variação do método inferiores aos estabelecidos pelos critérios de aceitação. Este facto foi corroborado pelos resultados dos testes estatísticos, que também se apresentaram todos eles, e à exceção do Teste de Mandel, fora dos limites definidos.

Os resultados iniciais foram de seguida tratados de modo a cumprir os critérios de aceitação definidos para cada teste. A gama de concentrações da curva de calibração foi encurtada para 0,30 - 2 mg/L.

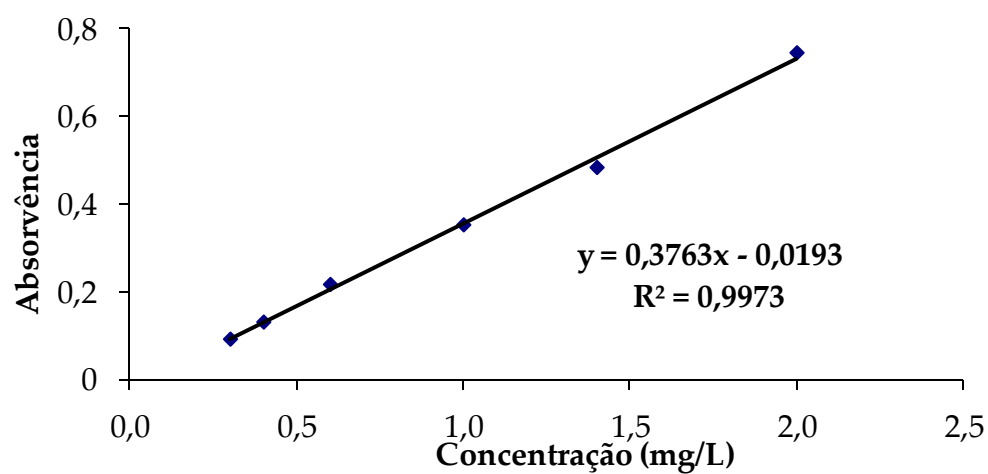
Tabela VI.10 - Resultados iniciais da gama de concentrações estudada para avaliação da linearidade do método de redução pelo cádmio com adição de solução de ativação.

Parâmetro	Resultado
Número de pontos de calibração (N)	10
Intervalo de concentrações (mg/L)	0,30 – 5,0
Equação da reta	$y = 0,2827x + 0,0489$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,984
Coeficiente de variação do método (CV_m , %)	11,9
Teste de análise de resíduos (%)	[-30,46; 21,60]
Teste das áreas normalizadas (%)	[74,59; 102,8]
Teste de RIKILT (%)	[83,0; 115]
Teste de Mandel, $VT \leq F(1, N-3, 95\%)$	$0,47 \leq 5,6$
LOD, mg/L	0,663
LOQ, mg/L	2,21

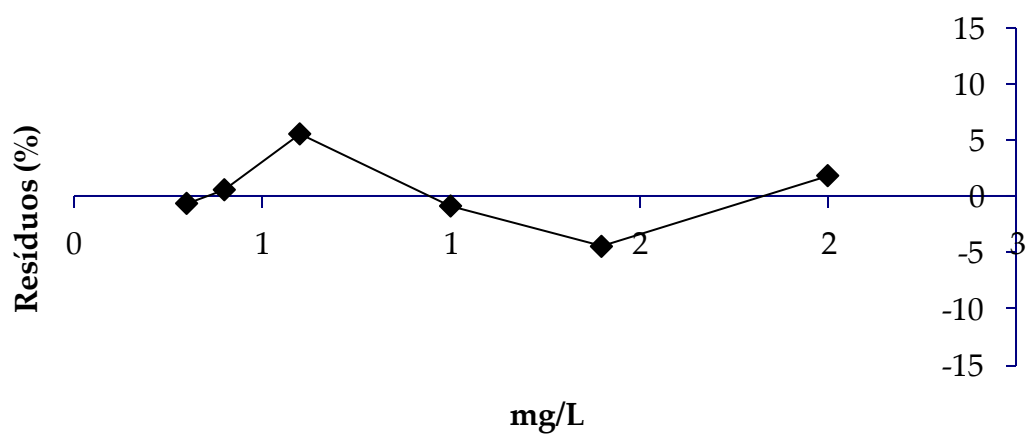
A figura VI.2 apresenta os resultados dos testes estatísticos para o estudo da linearidade do método de redução pelo cádmio com adição de solução de ativação, na gama de concentrações entre 0,30 e 2,0 mg/L, nomeadamente do método dos mínimos quadrados, da análise de resíduos, do teste das áreas normalizadas e do teste de RIKILT.

O método é linear no intervalo de concentrações estudado (0,30 – 2 mg/L NO_3), apresentando um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,997$), um $CV_m < 10\%$ ($CV_m = 2,93\%$) e um valor de teste (VT) inferior ao valor tabelado F de Fisher/Snedecor ($F(1;N-3;95\%)$) ($-2,83 < 10,13$).

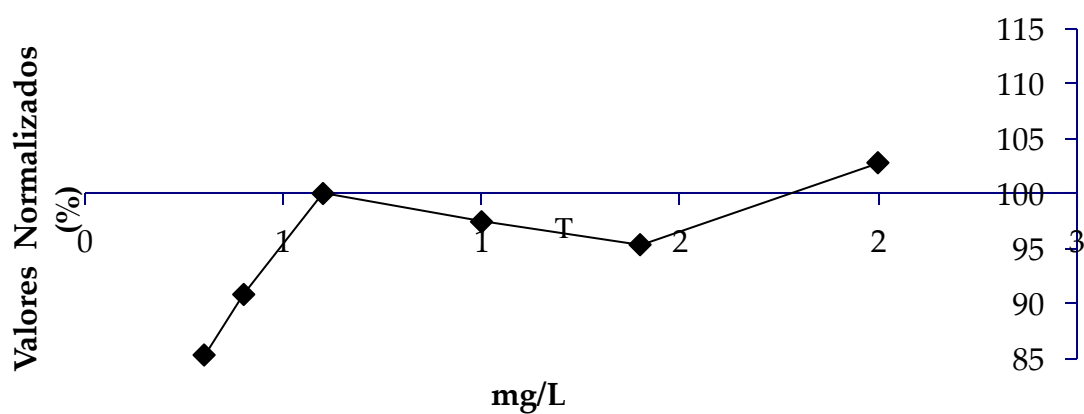
(a)



(b)



(c)



(d)

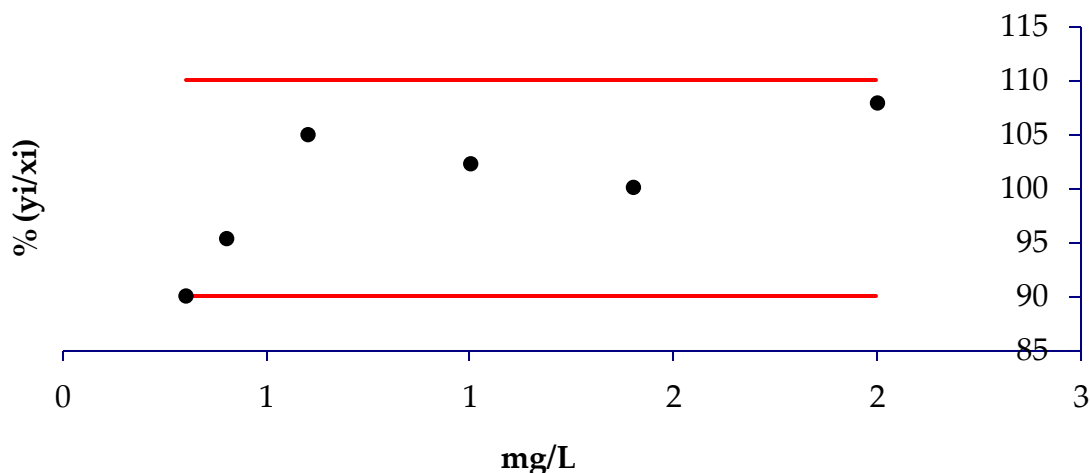


Figura VI.2 – Testes estatísticos para o estudo da linearidade pelo método de redução pelo cádmio com adição de solução de ativação. (a) Aplicação do método dos mínimos quadrados – curva de calibração, (b) análise de resíduos, (c) teste das áreas normalizadas, (d) teste de RIKILT.

1.3.2. Gama de trabalho

Após a definição do intervalo de linearidade aplicou-se o teste de homogeneidade de variâncias aos extremos de concentração deste intervalo, nomeadamente aos pontos 0,30 e 2 mg/L, verificando-se que a gama de trabalho está bem ajustada $VT(5,2) < F(5,35)$.

1.3.3. Limiares analíticos (LOD e LOQ)

Os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados com base na reta de calibração, tendo em conta o declive e a ordenada na origem, e em condições de repetibilidade. Os resultados obtidos são descritos na tabela VI.11.

Tabela VI.11 – Limiares analíticos do método de redução pelo cádmio, com solução de ativação, com base em ensaios de repetibilidade e nos parâmetros da curva de calibração.

Limiares analíticos	Reta de calibração	Condições de repetibilidade
LOD (mg/L)	0,12	0,20
LOQ (mg/L)	0,38	0,66

Como os limites de quantificação determinados a partir da reta de calibração e com base em ensaios de repetibilidade são superiores ao primeiro ponto da gama de trabalho, os valores serão reportados com base nos limites de detecção.

Na análise das amostras serão quantificáveis todos os valores superiores ou iguais a 0,30 mg/L (NO_3^-), as amostras com concentrações inferiores serão reportadas como < LOD (0,20 mg/L NO_3^-).

1.3.4. Precisão

A tabela VI.12 apresenta os resultados obtidos no estudo da precisão intermédia, avaliada com base no desvio-padrão relativo (DPR %) de dois níveis de concentração de precisão intermédia (R_i).

Tabela VI.12 – Estudo da precisão do método de redução pelo cádmio, sem solução de ativação, em condições de precisão intermédia (n=10).

Concentração nitratos (mg/L)	Precisão intermédia	
	DPR (%)	R _I
0,30	17	0,073
2	15	0,292

1.3.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação, através da análise de 4 amostras de sopas diferentes fortificadas com 8,8 mg/kg de nitratos (sopa de batata vermelha, sopa de feijão verde, sopa de agrião e sopa de legumes). A tabela VI.13 apresenta os resultados das recuperações (Rec %) obtidas para cada matriz.

Tabela VI.13 – Estudos de recuperação de nitratos em várias matrizes alimentares (sopas) para o método de redução pelo cádmio com solução de ativação.

	Sopa de			
	Batata vermelha	Feijão verde	Agrião	Legumes
Rec (%), n=4	116	62	74	113

A recuperação média das quatro sopas rodou os 92% embora a sopa de feijão verde e a de agrião tenham recuperações inferiores a 75%. Um dos fatores que podem originar estes valores prendem-se com a homogeneização da amostra porque ambos os vegetais são difíceis de triturar/homogeneizar.

2. Análise das amostras

2.1. Análise de vegetais

Depois de validado, o método espectrofotométrico foi aplicado na análise de 167 amostras de produtos vegetais, em representação de 25 espécies vegetais diferentes. A tabela VI.14 apresenta os teores de nitratos presentes nas 167 amostras analisadas.

A maioria das amostras apresenta concentrações em nitratos muito superiores ao limite de deteção do método. A representatividade de amostras positivas é de 100% para a maioria das amostras, com exceção de quatro vegetais cujo número de amostras positivas ronda os 67% (alho-francês e batata branca), 50% (cenoura) e 57% (nabo). Apenas o alho, a cebola, as ervilhas e os grelos de couve apresentaram concentrações de nitratos inferiores ao LOQ do método analítico (0,40 mg/L).

Considerando a totalidade das amostras analisadas, os valores de concentração média mais elevados correspondem, por ordem decrescente, ao espinafre, à alface-frisada e à nabiça, com teores médios de nitratos de 1108, 990 e 808 mg/kg NO₃⁻ respetivamente. A alface-frisada apresenta o valor de concentração máxima mais elevado, com 2592 mg/kg NO₃⁻, seguida do espinafre, com 2407 mg/kg NO₃⁻, e da nabiça, com 1762 mg/kg NO₃⁻.

Tabela VI.14 – Teores de nitratos presentes em diversos tipos de vegetais comercializados em Portugal continental.

Espécie vegetal	N	Amostras positivas	mg NO ₃ /kg				DPR %
			Média	Mediana	Mínimo	Máximo	
Abóbora	7	7	312	27,3	17,7	712	116
Alho	-	0	-	-	-	-	-
Alho-francês	6	4	142	90,6	< LOQ	384	112
Alface-frisada	11	11	990	597	81,1	2,59×10	95,5
Alface-iceberg	4	4	304	302	280	334	6,32
Alface lisa	4	4	420	289	203	898	77,3
Alface roxa	4	4	400	453	122	522	40,4
Agrião	7	7	227	218	129	303	24,9
Batata branca	6	4	64,9	35,8	< LOQ	163	116
Batata vermelha	7	7	114	107	33,8	189	58,1
Brócolos	6	6	198	205	123	266	28,9
Cebola	-	0	-	-	-	-	-
Cenoura	6	3	21,9	8,40	< LOQ	91,6	162
Chuchu	7	7	102	99,0	71,4	146	23,1
Couve coração-de-boi	10	10	330	317	183	634	40,2
Couve-flor	6	6	23,4	24,6	7,10	34,8	42,1
Couve-lombarda	9	9	246	228	25,5	596	76,6
Couve portuguesa	4	4	422	424	311	524	22,2
Courgette	11	11	247	146	88,7	893	102
Ervilhas	-	0	-	-	-	-	-
Espinafre	4	4	1108	737	553	2,41×10	78,6
Espinafre biológico	3	3	148	136	134	173	14,9
Feijão verde	9	9	502	537	142	759	35,8
Grelos de couve	-	0	-	-	-	-	-
Nabiças	11	11	808	884	299	1,76×10	48,4
Nabo	7	4	403	487	< LOQ	847	97,5
			Avaliação global				
			Mínimo	21,9	8,40	< LOQ	34,8
			Máximo	1108	884	553	2,59×10

Tendo em conta o Regulamento (UE) N.º 1258/2011 de 2 de Dezembro (40) que fixa os teores máximos de nitratos em alguns géneros alimentícios, nomeadamente em espinafres frescos, alface fresca e alface-iceberg, podemos concluir que nenhum destes vegetais ultrapassou o teor máximo legislado.

Apesar do âmbito do estudo não incluir a avaliação da variação dos teores de nitratos face a fatores ambientais ou agrícolas, foram analisadas amostras de espinafres correspondentes a dois métodos de cultivo distintos: em campo ou em estufa e em agricultura biológica. A diferença no teor médio de nitratos entre ambos é bastante evidente, com uma redução de 87% do teor médio de nitratos nos espinafres cultivados em agricultura biológica, face aos espinafres de campo ou de estufa. Este facto corrobora o descrito anteriormente na introdução teórica (17).

Apesar de não existir legislação específica quanto ao teor máximo de nitratos em batatas, alguns países como a Alemanha e Polónia começaram a impor limites máximos para o teor de nitratos em batatas importadas (102). A Alemanha restringiu a importação de batatas com um teor de nitratos superior a 200 mg NO₃/kg, enquanto a Polónia afixou como limite máximo 183 mg NO₃/kg. No que diz respeito aos valores de concentração média das batatas analisadas, podemos concluir que estes cumpriram os requisitos estipulados por estes dois países. No entanto, a batata vermelha apresenta uma concentração máxima de 189 mg NO₃/kg, o que já excederia o limite máximo imposto pela Polónia.

Tendo em conta a classificação apresentada no anexo A, que categoriza os vegetais de acordo com o seu teor de nitratos, dividindo-os em 5 categorias (muito baixo, baixo, intermédio, elevado e muito elevado), podemos concluir que:

- Na categoria “muito baixo” (teor < 200 mg NO₃/kg), o alho, a cebola, as ervilhas, a batata branca e a batata vermelha corresponderam ao valor esperado, apresentando como valor médio mais elevado 114 mg NO₃/kg, correspondente à batata vermelha. No entanto, o feijão verde, também

presente nesta categoria, ultrapassou o valor esperado, apresentando como valor médio 502 NO₃/kg, chegando mesmo a apresentar um valor máximo de 759 NO₃/kg. A presença deste vegetal nesta categoria pode vir a ser questionada se esta tendência de verificar em estudos futuros.

- Na categoria “baixo” (entre 200 e 500 mg NO₃/kg), apenas a courgette e a abóbora apresentaram valores médios concordantes com o estipulado: 247 e 312 mg NO₃/kg, respetivamente. No entanto, ambos exibiram valores máximos superiores ao limite estabelecido, 712 e 893 mg NO₃/kg, respetivamente para a abóbora e courgette. Os brócolos apresentaram um valor médio ligeiramente inferior ao limite do intervalo estipulado (198 mg NO₃/kg), apesar de ter como valor máximo 266 mg NO₃/kg. A couve-flor e a cenoura apresentaram valores médios significativamente inferiores ao intervalo estabelecido (23,4 e 21,9 mg NO₃/kg, respetivamente), pelo que seria discutível a possibilidade de serem enquadrados na categoria anterior.
- Na categoria “intermédio” (500-1000 mg NO₃/kg), todos os vegetais apresentaram teores médios inferiores ao intervalo estipulado. No entanto, se tivéssemos em conta o valor máximo medido, a couve coração-de-boi, o nabo e a couve-lombarda, já se enquadrariam na gama definida, com valores de 634, 847 e 596 mg NO₃/kg, respetivamente. A alface-iceberg nunca apresentou um valor suficientemente elevado para se enquadrar nesta classificação (valor máximo: 334 mg NO₃/kg).
- Na categoria “elevado” (entre 1000-2500 mg NO₃/kg), verificou-se novamente a tendência, com todos os vegetais a apresentarem valores médios inferiores ao intervalo estabelecido: 990 e 142 mg NO₃/kg, respetivamente para a alface-frisada e alho-francês. No entanto, o teor médio da alface-frisada encontra-se no limiar do intervalo estipulado, exibindo mesmo um valor máximo superior

ao limite máximo estabelecido (2592 mg NO₃/kg), enquanto o alho-francês apresenta um teor médio, e até mesmo máximo (384 mg NO₃/kg) bastante inferiores ao intervalo estabelecido, indicando que deverá ser discutida a sua presença nesta categoria.

- Por fim, na categoria “muito elevado” (teor > 2500 mg NO₃/kg), os vegetais apresentam novamente valores médios bastante inferiores ao valor tabelado, 227 e 1108 mg NO₃/kg para os agriões e para os espinafres, respetivamente, ambos cultivados em agricultura convencional. Os espinafres apresentam um teor máximo de 2407 mg NO₃/kg que se revela, ainda assim, inferior ao intervalo estipulado. Os espinafres biológicos apresentam, obviamente, valores ainda mais baixos que os anteriores, 148 mg NO₃/kg, indicando, à semelhança do verificado para os agriões, que deverá ser discutida a sua presença nesta categoria.

A alface roxa, o chuchu, a couve portuguesa e a nabiça não puderam ser sujeitos a esta comparação, uma vez que não foram contemplados pelos autores e não se encontram descritos no anexo A.

A ASAE efetuou uma pesquisa do teor de nitratos em 145 amostras de produtos hortícolas, entre 2007 e 2010, nomeadamente em espinafres, alfaces, salsa, coentros, couve e grelos-de-nabo (163). De todos estes vegetais, algumas amostras de espinafres e alfaces apresentaram-se não conformes, com teores de nitratos entre os 3000 e os 4500 mg NO₃/kg, o que não foi ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo.

Tendo em conta um estudo destinado a avaliar o teor de nitratos em vegetais frescos (57), podemos concluir que os brócolos (198 mg/kg), a couve coração-de-boi (330 mg/kg), as alfaces (304-990 mg/kg), e as batatas (64,9-114 mg/kg) apresentam valores de concentração média relativamente concordantes com os valores apresentados: 154

mg/kg, 400 mg/kg, 581-1241 mg/kg e 81 mg/kg, respetivamente. No entanto, o alho (<LOQ), a cebola (<LOQ), a couve-flor (23,4 mg/kg), a cenoura (21,9 mg/kg) e os espinafres (1108 mg/kg) apresentaram valores bastante díspares com os apresentados pelos autores: 34 mg/kg, 32 mg/kg, 202 mg/kg, 195 mg/kg e 1845 mg/kg, respetivamente. De uma forma geral, os valores são inferiores aos apresentados no estudo.

Verificou-se que os legumes que apresentam maior teor de nitratos pertencem às famílias *Amaranthaceae* e *Asteraceae*, que englobam os espinafres e a alface, respetivamente, e que os vegetais com níveis mais baixos de nitratos pertencem às famílias *Fabaceae* (ervilha) e *Solanaceae* (batata), tal como o descrito por alguns autores (9-11). O agrião contrariou esta tendência, já que fazia parte dos vegetais descritos como os que possuem elevados teores de nitratos, pertencendo à família *Brassicaceae*.

Para além destas famílias referidas, verificou-se que as nabiças (808 NO₃/kg), o feijão verde (502 NO₃/kg), a couve portuguesa (422 NO₃/kg) e o nabo (403 NO₃/kg) também apresentam valores médios relativamente elevados. As nabiças, o nabo e a couve portuguesa pertencem à família *Brassicaceae*, enquanto o feijão-verde pertence à família *Fabaceae*. O alho, a cebola, a cenoura e a couve-flor também apresentaram valores médios de nitratos bastante reduzidos, com o alho e a cebola a exibirem valores inferiores ao limite de deteção do método. O alho pertence à família *Liliaceae*, a cebola pertence à família *Alliaceae*, a cenoura pertence à família *Apiaceae* e a couve-flor à família *Brassicaceae*. Podemos concluir que a família *Brassicaceae* inclui vegetais que podem apresentar uma ampla gama de concentrações de nitratos, desde 23,4 NO₃/kg no caso da couve-flor, e 808 NO₃/kg no caso das nabiças.

Concluiu-se que os vegetais folhosos como a alface, os espinafres e a nabiça apresentam concentrações mais elevadas de nitratos, em comparação com órgãos de armazenamento como a batata, a cenoura, a cebola, o alho-francês e as sementes e

vagens de ervilhas que apresentam concentrações mais reduzidas, de acordo com o descrito na literatura (11).

Os vegetais de folha verde são efetivamente os que apresentam níveis de nitratos mais elevados, de acordo com o referido por alguns autores (11, 15). No entanto, as concentrações médias destes produtos hortícolas não refletiu as valores descritos na literatura (acima de 1000 mg/kg ou até de 2500 mg/kg) (3, 9, 10). Apenas o espinafre apresentou valores médios superiores a 1000 mg NO₃/kg (1108 mg NO₃/kg). Todos os outros vegetais de folha verde apresentaram valores médios inferiores a 1000 mg NO₃/kg, tendo a grande maioria deles apresentado valores médios inferiores a 450 mg NO₃/kg, como foi o caso da alface-iceberg, da alface-lisa, da alface-roxa, do agrião, da couve coração-de-boi, da couve-lombarda, da couve portuguesa, dos espinafres biológicos e dos grelos de couve.

Os valores de DPR (%) são, de um modo geral, muito elevados, traduzindo a grande amplitude de concentrações de nitratos que os vegetais podem apresentar. Esta variação pode ser discutida tendo em conta vários fatores ambientais, agrícolas e genéticos, enumerados na seção 4 do capítulo I. No entanto, não dispomos de dados suficientes para poder estabelecer um padrão de variação, já que estes fatores não foram tidos em conta na análise dos vegetais.

Relativamente aos nitritos, todas as amostras apresentaram uma concentração em nitritos inferior ao LOD (0,005 mg NO₂/L), correspondendo aos valores referidos na literatura (2 mg/kg) (3, 54).

2.2. Análise de sopas

O método espectrofotométrico foi também aplicado na análise de 16 sopas diferentes, apresentando na sua composição 18 espécies vegetais distintas.

Foram analisadas um total de 51 amostras, correspondentes a 3 réplicas de cada uma das 16 sopas e da base preparadas. A tabela VI.15 apresenta os teores de nitratos presentes nas 51 amostras analisadas. As sopas estão apresentadas por ordem de introdução do vegetal nas sopas dos bebés (89, 92).

Em todos os tipos de sopa também foram analisados duplicados dos extratos obtidos de um dos replicados de sopa. A tabela VI.16 apresenta os resultados obtidos.

A base e as sopas de batata branca, cenoura, abóbora, couve-flor e nabiças apresentam teores de nitratos inferiores ao limite de deteção (LOD) do método analítico (0,20 mg/L).

Os valores obtidos são precisos, com um desvio padrão relativo entre 5,1 e 26%. A análise de duplicados das sopas após extração apresentou valores entre 0,92 e 17%, indicando que o maior fator de variação é o processo de extração dos nitratos da matriz alimentar.

Os valores de DPR (%) foram muito inferiores aos apresentados na análise dos vegetais, o que sugere que o processo de confeção das sopas, com a introdução de um robô de cozinha, permite uma melhor homogeneização das amostras e uma menor variabilidade dos resultados finais.

Tabela VI.15 – Concentração em nitratos nas sopas destinadas à alimentação infantil e confeccionadas em casa.

Sopa	DPR (%) n=3	mg NO ₃ /kg			
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo
Base	a)				
Batata branca	a)				
Batata vermelha	26	15,2	15,2	< LOD	18,0
Cenoura	a)				
Abóbora	a)				
Courgette	5,1	116	116	112	120
Alho-francês	24	48,7	48,7	40,4	57,1
Chuchu	20	28,2	30,9	21,6	31,9
Feijão verde	16	82,0	89,0	67,3	89,0
Brócolos	11	43,6	43,6	40,2	47,0
Nabiça	a)				
Alface-frisada	15	149	142	131	173
Agrião	10	99,1	102	88,0	108
Espinafre	20	83,7	83,7	71,9	95,5
Couve-lombarda	23	44,6	47,5	33,3	53,0
Couve-flor	a)				
Legumes	12	48,7	47,2	43,8	55,1

a) NO₃⁻ (mg/kg) < LOD

Tabela VI.16 – A análise da diferença de duplicados (DD %) dos extratos das sopas destinadas à alimentação infantil e confeccionadas em casa.

Sopa	DD (%)
Batata vermelha	1,5
Courgette	17
Alho-francês	6,5
Chuchu	2,1
Feijão verde	2,2
Brócolos	0,92
Alface frisada	8,5
Agrião	6,6
Espinafre	17
Couve-lombarda	4,0
Legumes	15

Tendo em conta a totalidade das amostras, a sopa de alface frisada foi a que apresentou teores mais elevados de nitratos, com um valor médio de 149 mg/kg NO₃, seguida da sopa de courgette, com 116 mg/kg NO₃ e da sopa de agrião, com uma concentração média de 99,1 mg/kg NO₃. Ao contrário do que seria de esperar, a sopa de espinafre surge apenas em quarto lugar da contagem decrescente, com um teor médio de 83,7 mg/kg NO₃. A sopa de batata vermelha e a sopa de chuchu foram as que apresentaram concentrações mais reduzidas de nitratos, com um teor médio de 15,2 e 28,2 mg/kg NO₃, respetivamente.

O Regulamento (UE) N.º 1258/2011 de 2 de Dezembro (40) fixa também os teores máximos de nitratos em alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens. Uma vez que as sopas confeccionadas de forma caseira têm o intuito de servirem como refeição a lactentes e crianças, estas podem ser consideradas como um alimento destinado à alimentação infantil, podendo assim ser avaliadas ao abrigo desta legislação comunitária. Considerando a totalidade das amostras analisadas, conclui-se que nenhuma ultrapassou o teor máximo de nitratos estabelecido, de 200 mg NO₃/kg.

Relativamente aos nitritos, todas as amostras apresentaram uma concentração em nitritos inferior a 0,005 mg NO₂/L.

Ao consultarmos as recomendações e indicações de receitas por parte de marcas comerciais de alimentação infantil, como a Nutribén®, a Nestlé®, entre outras, é notória a ausência de vegetais folhosos com teores de nitratos reconhecidamente elevados, como os espinafres, as nabiças e os agriões. Esta tendência é também visível na composição de boiões de refeições à base de legumes, onde tem sido notória a substituição gradual destes vegetais por outros com um teor de nitratos mais reduzido, como as ervilhas, por exemplo. No entanto, nas receitas de sopas recomendadas, ainda está presente a alface, e em quantidades bastante elevadas (cerca de 130g por sopa), o que pode representar um risco potencial para os bebés, devido aos elevados valores de concentração de nitratos que este vegetal pode apresentar.

3. Avaliação da exposição

A avaliação da exposição considera os níveis do composto-alvo presentes no alimento e a quantidade de alimento consumido por determinado indivíduo ou grupo populacional, de forma a ser possível o cálculo do IR (índice de risco). O IR deve situar-se abaixo de 1, existindo um risco potencial para valores de fração > 1.

O IR pode ser definido de acordo com a equação:

$$IR = \frac{ADD}{ADI} \quad (\text{equação 14})$$

Onde,

ADD representa a ingestão diária média (mg NO₃/kg/dia);

ADI representa a dose diária admissível (mg NO₃/kg/dia).

O valor da ADI para nitratos foi previamente definida pelo Comité Científico para a Alimentação Humana (SCF) em 3,7 mg NO₃/kg peso corporal/dia (11, 14).

O valor da ADD pode ser calculado segundo a equação:

$$ADD = \frac{\text{Concentração NO}_3 \text{ no alimento } \left(\frac{mg}{kg}\right) \times \text{Quantidade alimento ingerido } \left(\frac{kg}{dia}\right)}{\text{Peso corporal (kg)}} \quad (\text{equação 15})$$

Tendo em conta que os produtos hortícolas de folha representam a principal fonte de exposição aos nitratos, será avaliado o IR para os principais vegetais analisados desse grupo, assim como para outros vegetais que tenham apresentado teores médios de nitratos elevados.

A OMS recomenda que a diversificação alimentar não se inicie antes dos 4-6 meses de idade (28). No entanto, como já demonstrado por alguns autores, é frequente a introdução de outros alimentos na dieta do lactente antes dos seis meses de idade (83, 87), pelo que será considerada como data de início a faixa etária dos 4-6 meses de idade.

A Direção-Geral de Saúde apresentou o novo Programa Nacional de Saúde Infantil e Juvenil, com entrada em vigor a partir de Junho de 2013 (164), e que introduz, entre outras alterações, a adoção das curvas de crescimento da OMS, que servirão de base para o cálculo do IR neste estudo. Com base nessas novas curvas de crescimento, adotámos os valores de peso médio para cada idade e sexo considerados.

De seguida serão apresentados os valores dos Índices de Risco (IR) calculados, tendo em conta a idade, o peso e o sexo do bebé, assim como quantidade de alimento ingerido e a concentração média de nitratos que cada um apresentou no nosso estudo. A avaliação da exposição foi feita tendo em conta o consumo isolado do vegetal e consumo de sopa. Não sendo a avaliação da exposição o objetivo principal deste estudo, esta será feita de uma forma simplista de forma a possibilitar uma visão geral do risco toxicológico para bebés que ingeriram estes alimentos.

3.1. Avaliação da exposição no consumo de vegetais

As tabelas VI.17 e VI.18 apresentam os dados utilizados no cálculo do IR, assim como o valor final deste, de forma a avaliar a exposição ao consumo de vegetais de forma isolada, por lactentes entre os 4 e os 8 meses de idade, de ambos os sexos.

A quantidade de vegetal considerada no cálculo do IR teve origem em receitas de sopas que constam no site da Nestlé® (89), que visam servir de exemplo para os pais, e na prática caseira comum.

Para o cálculo do ADD, o valor da concentração de NO_3 no alimento corresponde ao valor médio de NO_3 no vegetal calculado neste estudo.

Tabela VI.17 – Avaliação da exposição a nitratos pelo consumo de vegetais para lactentes do sexo feminino (cálculo do IR).

Idade do bebé	Peso do bebé (kg)	Vegetal	Quantidade (g)	IR
4-5 meses	7	Alface [1]	130	4,9
		Feijão verde	100	1,9
		Courgette	100	0,9
		Brócolos	100	0,8
		Alho-francês	30	0,2
6-8 meses	8	Alface [1]	130	4,3
		Feijão verde	100	1,6
		Courgette	100	0,8
		Brócolos	100	0,7
		Alho-francês	30	0,1
		Espinafre	100	3,8
		Nabiça	100	2,7
		Agrião	100	0,8

[1] Para efeitos de cálculo considerou-se a alface frisada, uma vez que foi a que apresentou teores médios de nitratos mais elevados.

Tabela VI.18 – Avaliação da exposição a nitratos pelo consumo de vegetais para lactentes do sexo masculino (cálculo do IR).

Idade do bebé	Peso do bebé (kg)	Vegetal	Quantidade (g)	IR
4-5 meses	7,5	Alface [1]	130	4,6
		Feijão verde	100	1,8
		Courgette	100	0,9
		Brócolos	100	0,7
		Alho-francês	30	0,2
6-8 meses	8,5	Alface [1]	130	4,0
		Feijão verde	100	1,6
		Courgette	100	0,8
		Brócolos	100	0,6
		Alho-francês	30	0,1
		Espinafre	100	3,5
		Nabiça	100	2,6
		Agrião	100	0,7

[1] Para efeitos de cálculo considerou-se a alface frisada, uma vez que foi a que apresentou teores médios de nitratos mais elevados.

De uma forma geral, o valor máximo de Índice de Risco ($IR > 1$) foi ultrapassado no consumo de alface, feijão-verde, espinafre e nabiça. A courgette e o agrião situaram-se perto do valor máximo.

Verificou-se um valor máximo de IR no consumo de alface por bebés do sexo feminino com idades entre os 4 e os 6 meses (4,9) e os 6 e os 8 meses (4,3) e no consumo de alface por bebés do sexo masculino com idades entre os 4 e os 6 meses (4,6) e os 6 e os 8 meses (4,0). Existindo um risco potencial para valores de IR de fração > 1 , podemos afirmar que existe um risco potencial na exposição de lactentes de ambos os sexos à ingestão de determinados vegetais com concentrações médias determinadas neste estudo (alface, feijão-verde, espinafre e nabica).

Considerou-se para efeitos de cálculo apenas o vegetal maioritário, não tendo sido contabilizada a contribuição dos restantes vegetais presentes no puré de legumes no aumento do teor de nitratos do puré final (batata, courgette, cenoura, cebola, entre outros).

É necessário ter em conta que um bebé com 4-5 meses de idade come apenas uma refeição de puré de legumes por dia, enquanto que aos 6 meses de idade já começa a ingerir duas refeições diárias à base de legumes. Tendo em conta este fato, podemos concluir que o IR seria superior ao calculado para lactentes de ambos os sexos a partir dos 6 meses. É ainda importante salientar que a partir de determinada idade adicionam-se outro tipo de alimentos ao caldo de legumes, como a carne, originando um aumentando do teor de nitratos e nitritos da refeição final. A água adicionada às fórmulas infantis pode ainda revelar-se uma fonte importante de nitratos, contribuindo para um aumento dos valores de IR calculados.

3.2. Avaliação da exposição no consumo de sopas

As tabelas VI.19 e VI.20 apresentam os dados utilizados no cálculo do IR, assim como o valor final deste, de forma a avaliar a exposição ao consumo de sopas confeccionadas de forma caseira, por lactentes entre os 4 e os 8 meses de idade, de ambos os sexos.

A quantidade de sopa considerada no cálculo do IR teve em consideração a quantidade encontrada em alimentos destinados à alimentação infantil comercializados pelas principais marcas.

Para o cálculo do ADD, o valor da concentração de NO_3 no alimento corresponde ao valor médio de NO_3 calculado nas sopas analisadas neste estudo.

Tabela VI.19 – Avaliação da exposição a nitratos pelo consumo de sopas para lactentes do sexo feminino (cálculo do IR).

Idade do bebé	Peso do bebé (kg)	Sopa	Quantidade (g)	IR
4-5 meses	7	Espinafre	200	0,6
		Courgette	200	0,9
		Feijão verde	200	0,6
		Alface	200	1,2
		Agrião	200	0,8
6-8 meses	8	Espinafre	250	0,7
		Courgette	250	1
		Feijão verde	250	0,7
		Alface	250	1,3
		Agrião	250	0,8

Tabela VI.20 – Avaliação da exposição a nitratos pelo consumo de sopas para lactentes do sexo masculino (cálculo do IR).

Idade do bebé	Peso do bebé (kg)	Sopa	Quantidade (g)	IR
4-5 meses	7,5	Espinafre	200	0,6
		Courgette	200	0,8
		Feijão verde	200	0,6
		Alface	200	1,1
		Agrião	200	0,7
6-8 meses	8,5	Espinafre	250	0,7
		Courgette	250	0,9
		Feijão verde	250	0,6
		Alface	250	1,2
		Agrião	250	0,8

De uma forma geral, o valor máximo de Índice de Risco ($IR > 1$) foi ultrapassado apenas no consumo de sopa de alface-frisada. A sopa de courgette apresentou valores muito próximos do valor máximo.

Verificou-se um valor máximo de IR no consumo sopa de alface-frisada por bebés do sexo feminino com idades entre os 4 e os 6 meses (1,2) e os 6 e os 8 meses (1,3) e no consumo de sopa de alface-frisada por bebés do sexo masculino com idades entre os 4 e os 6 meses (1,1) e os 6 e os 8 meses (1,2). Existindo um risco potencial para valores de IR de fração > 1 , podemos afirmar que existe um risco potencial na exposição de lactentes de ambos os sexos à ingestão de sopa de alface-frisada.

Deve ter-se em conta que as sopas confeccionadas e analisadas possuem mais vegetais na sua composição para além do vegetal principal enumerado (tabela V.2, seção 5.4, capítulo V).

Os valores de IR calculados a partir das sopas confeccionadas são, de um modo geral, significativamente inferiores aos apresentados pelos vegetais isolados, o que pode dever-se à utilização de menores quantidades de vegetais na confeção das sopas em laboratório, do que os indicados em receitas por marcas comerciais relacionadas com a alimentação infantil.

É necessário ter em conta que um bebé com 4-5 meses de idade come apenas uma refeição de legumes por dia, enquanto que aos 6 meses de idade já começa a ingerir duas refeições diárias à base de legumes, o que provocaria um aumento no valor de IR. Para além disso, ter em conta as restantes situações referidas no ponto anterior, que podem também contribuir para um aumento do IR calculado.

CONCLUSÃO

O método de espectrofotometria de absorção molecular na região UV/visível com reação de Griess permite a análise de nitratos e nitritos em vegetais e produtos à base destes, embora seja um método moroso, principalmente do processo de preparação das amostras, o que pode condicionar a sua implementação em rotina.

O método para análise de nitratos sem solução de ativação foi otimizado e validado, sendo linear no intervalo de concentrações entre 0,30 – 5,00 mg/L (NO_3), apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 0,999 e um coeficiente de variação do método (CV_m) inferior a 3% (2,48 %). O método apresenta uma boa precisão em condições de repetibilidade e em condições de precisão intermédia, com desvios-padrão relativos (DPR) inferiores ou iguais a 12%, apesar de apresentar um DPR muito elevado para o primeiro ponto da curva, já que este se encontra numa zona inferior ao limite de deteção e à gama de trabalho.

O limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) determinados em condições de repetibilidade foram de 0,12 e 0,40 mg/L NO_3 , respetivamente, sendo que foi considerado o valor de LOQ na quantificação das amostras.

A recuperação média das várias amostras vegetais foi de 101%, com um DPR de 15%, demonstrando a exatidão do método. O erro relativo médio associado às soluções controlo de 0,30 e 5 mg/L foi de 9,5% e 7,5%, respetivamente.

O método para análise de nitratos com solução de ativação, após otimização e validação, demonstra ser linear no intervalo de concentrações entre 0,30 – 2,00 mg/L (NO_3), apresentando um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,997$) e um $\text{CV}_m < 10\%$ ($\text{CV}_m = 2,93\%$). O método é preciso em condições de precisão intermédia, apresentando valores de DPR inferiores ou iguais a 17%.

O LOD e o LOQ determinados em condições de repetibilidade foram de 0,20 e 0,66 mg/L NO_3 , respetivamente, sendo os valores das amostras reportados com base nos limites de deteção.

A recuperação média das amostras de sopas foi de cerca de 92%, embora algumas tenham apresentado recuperações inferiores a 75%.

O método otimizado e validado é linear no intervalo de concentrações entre 0,04-1,00 mg/L (NO_2), apresentando um ótimo limite de determinação (R^2) de 1,00 e um coeficiente de variação do método (CV_m) de 0,16%, para os nitritos.

Relativamente à análise das amostras de vegetais, o teor médio de nitratos variou entre 64,9 e 1108 mg NO_3/kg . O alho, a cebola, as ervilhas e os grelos de couve apresentaram concentrações de nitratos inferiores ao LOQ do método analítico (0,20 mg/L). Os valores de concentração média mais elevados correspondem ao espinafre, à alface-frisada e à nabiça, com teores médios de nitratos de 1108, 990 e 808 mg/kg NO_3^- respetivamente. A alface-frisada apresenta o valor de concentração máxima mais elevado, com 2592 mg/kg NO_3^- , seguida do espinafre, com 2407 mg/kg NO_3^- , e da nabiça, com 1762 mg/kg NO_3^- . Nenhum vegetal ultrapassou o teor máximo previsto na legislação.

Os vegetais de folha verde apresentaram os níveis de nitratos mais elevados, apesar dos valores de concentração média não ter refletido os valores descritos na literatura.

Relativamente à análise das amostras de sopas confecionadas, o teor médio de nitratos variou entre 15,2 e 149 mg NO_3/kg . A base e as sopas de batata branca, cenoura, abóbora, couve-flor e nabiças apresentam teores de nitratos inferiores ao LOD. A sopa de alface frisada apresentou os teores médios mais elevados de nitratos, com um valor médio de 149 mg/kg NO_3 , seguida da sopa de courgette, com 116 mg/kg NO_3 e da sopa de agrião, com 99,1 mg/kg NO_3 . Nenhuma amostra de sopa ultrapassou o teor máximo de nitratos estabelecido na legislação.

O cálculo do Índice de Risco (IR), realizado na avaliação da exposição ao consumo de vegetais, demonstrou que este seria ultrapassado na maioria das situações, e em alguns casos em larga escala para a alface, feijão verde, espinafre e nabiça, permitindo afirmar a existência de um risco potencial na exposição de lactentes à ingestão das quantidades consideradas destes vegetais. O IR calculado para a avaliação da exposição de lactentes ao consumo das sopas confeccionadas foi superior ao admitido apenas no consumo de sopa de alface-frisada.

Apesar de nenhuma amostra analisada neste trabalho ter concentrações superiores aos limites impostos pela legislação vigente, é necessário ter em conta outros fatores implícitos da alimentação de bebés e crianças jovens e que podem ter um papel crucial no aumento da exposição a nitratos e nitritos, como a ingestão de carne e produtos cárneos e de água, os quais são também fontes de nitratos e nitritos.

Apesar de nenhum vegetal ter excedido o limite máximo de nitratos legislado, pode verificar-se pertinente a previsão de limites máximos para outros vegetais para além dos que constam presentemente na legislação, e que também apresentam frequentemente elevados teores de nitratos, como as nabiças, alguns tipo de couves, o feijão verde e até mesmo a courgette e o nabo.

A obtenção de valores de concentração tão reduzidos nas sopas confeccionadas pode dever-se ao facto de terem sido adicionadas pequenas quantidades de vegetais, em especial no caso dos vegetais de folha verde. De futuro dever-se-á proceder à confeção das sopas de acordo com as recomendações de algumas marcas de alimentação infantil, cujas quantidades de vegetais folhosos recomendadas são bastante superiores às utilizadas neste trabalho.

O DPR elevado das amostras de vegetais, sugere que deva ser implementado um procedimento mais eficaz de trituração e homogeneização das amostras, para que se atinjam variações inferiores no teor de nitratos.

O elevado valor de erro relativo associado ao controlo de 0,30 mg/L indica que, em trabalhos futuros, possa ser necessário o aumento da concentração do primeiro ponto da curva de calibração.

Bibliografia e referências bibliográficas

1. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Riscos Químicos, 2011 [cited 2013 02/10/2013]. Available from: <http://www.asae.pt/>.
2. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal. Ministério da Economia e da Inovação. Direcção de Avaliação e Comunicação dos Riscos; 2009.
3. International Agency for Research on Cancer. Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2010. p. 45-325.
4. Chang R. Química. 8ª Edição ed 2005. p. 1039
5. U.S. EPA Environmental Protection Agency. Nitrates and Nitrites - Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health - TEACH Chemical Summary. U.S. EPA, 2007.
6. U.S. EPA Environmental Protection Agency. Inorganic Nitrate/Nitrite (Sodium and Potassium Nitrates). RED Facts1991.
7. Iammarino M, Di Taranto A, Cristino M. Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: Results of five years of official controls and monitoring. Food Chem. 2013;140(4):763-71.
8. Moorcroft MJ, Davis J, Compton RG. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. Talanta. 2001;54(5):785-803.
9. Santamaria P. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. J Sci Food Agric2006. p. 10-7.
10. Council of Europe. Nitrates and nitrites in foodstuffs. Netherlands: 1993.
11. EFSA European Food Safety Authority. Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. The EFSA Journal. 2008;689:1-79.
12. Jon OL, Eddie W, Mark TG. The nitrate- nitrite- nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery. 2008;7(2):156.

13. Du S-t, Zhang Y-s, Lin X-y. Accumulation of Nitrate in Vegetables and Its Possible Implications to Human Health. *Agricultural Sciences in China*. 2007;6(10):1246-55.
14. European Commission. Opinion of the Scientific Committee for Food on Nitrates and Nitrite. Luxembourg: 1997.
15. EFSA European Food Safety Authority. Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. *EFSA Journal*. 2010.
16. Weightman RM, Dyer C, Buxton J, Farrington DS. Effects of light level, time of harvest and position within field on the variability of tissue nitrate concentration in commercial crops of lettuce (*Lactuca sativa*) and endive (*Cichorium endiva*). *Food Addit Contam*. 2006;23(5):462-9.
17. Mario Miyazawa CAKeLAOP. Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico Instituto Agrônômico do Paraná. 2001:23.
18. Omar SA, Artime E, Webb AJ. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. *Nitric Oxide*. 2012;26(4):229-40.
19. Carlsson S, Wiklund NP, Engstrand L, Weitzberg E, Lundberg JON. Effects of pH, nitrite, and ascorbic acid on nonenzymatic nitric oxide generation and bacterial growth in urine. *Nitric Oxide-Biol Chem*. 2001;5(6):580-6.
20. B. Bartholomew MJH. The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food and Chemical Toxicology*. 1984;Volume 22(10):789-95.
21. Cortas NK WN. Pharmacokinetic aspects of inorganic nitrate ingestion in man. 1991.
22. Assembly of Life Science. The health effects of nitrate and N-Nitroso compounds: National Academy Press; 1981. Available from: <http://www.archive.org/details/healtheffectsofn004248mbp>.
23. Associação Portuguesa dos Nutricionistas. Alimentação Adequada: Faça mais pela sua Saúde! In: Cordeiro T. 2011.
24. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Tabela da Composição de Alimentos. Centro de Segurança Alimentar e Nutrição. 2006.
25. Direção-Geral de Saúde. Manual para uma alimentação Saudável em jardins de infância. In: Emília Nunes JB, Ministério da Saúde.

26. Ferreira FAG. Nutrição Humana 1983.
27. JS Garrow WJ, A Ralph. Human Nutrition and Dietetics. 10th edition ed: Churchill Livingstone; 2000.
28. Aires Cleofas da Silva JG-P. Nutrição Pediátrica - Princípios Básicos. Lisboa: Clínica Universitária de Pediatria, Hospital de Santa Maria; 2005.
29. Organização das Nações Unidas. Fruit and Vegetables for Health Report of a Joint FAO/WHO Workshop 2004.
30. World Health Organization. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases - Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation 2003.
31. Moreira AR. Diversificação alimentar : o início da aprendizagem para uma vida saudável. In: Rego C, editor.: Porto : edição de autor; 2005.
32. Ministério da Saúde-Unidade Local de Saúde de Matosinhos. Alimentação Infantil no 1º Ano de Vida - Guia de Aconselhamento
33. European Commission. Opinion on nitrate and nitrite. Reports of the Scientific Committee for Food (SCF) 26th Series. 1992. p. 21 -8.
34. Butler AR, Feelisch M. Therapeutic Uses of Inorganic Nitrite and Nitrate: From the Past to the Future. Circulation. 2008;117(16):2151-9.
35. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Nitrates and Nitrites. U.S. Department of Health and Human Services; 2011.
36. Fewtrell L. Drinking- water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. Environmental Health Perspectives. 2004;112(14):1371.
37. Bradberry S. Methaemoglobinaemia. Medicine. 2012;40(2):59-60.
38. Greer FR, Shannon M. Infant methemoglobinemia: The role of dietary nitrate in food and water. Pediatrics. 2005;116(3):784-6.
39. Regulamento No 1881/2006 de 19 de Dezembro de 2006. Teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios (2006).
40. Regulamento No 1258/2011 de 2 de Dezembro de 2011. Teores máximos de nitratos nos géneros alimentícios (2011).
41. ISO International Organization for Standardization. Method 3091: Meat and Meat Products — Determination of Nitrate Content Geneva 1975.

42. AOAC International. Method 993.03 - Nitrate in Baby Foods - Official Methods of Analysis of AOAC International. Spectrophotometric Method 2000.
43. AOAC. Method 935.48 - Nitrates and Nitrites in Meat - Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Ed ed. Gaithersburg 2000.
44. AOAC. Method 973.31 - Nitrates and Nitrites in Meat - Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Ed ed. Gaithersburg 2000.
45. CEN European Committee for Standardization. Foodstuffs. Determination of nitrate and/or nitrite content. Part 3: Spectrometric determination of nitrate and nitrite content of meat products after enzymatic reduction of nitrate to nitrite. 2005.
46. ISO International Organization for Standardization. Method 6635: Fruits, Vegetables and Derived Products — Determination of Nitrite and Nitrate Content — Molecular Absorption Spectrometric Method. Geneva 1984.
47. CEN European Committee for Standardization. Foodstuffs. Determination of nitrate and/or nitrite content. Part 4: Ion-exchange chromatographic (IC) method for the determination of nitrate and nitrite content of meat products. 2005.
48. CEN European Committee for Standardization. Foodstuffs - Determination of nitrate and/or nitrite content – Part 2: HPLC/IC method for the determination of nitrate content of vegetables and vegetables products. Bélgica 1997.
49. Santamaria P, Elia A, Parente A, Serio F. Fertilization strategies for lowering nitrate content in leafy vegetables: Chicory and rocket salad cases. *J Plant Nutr.* 1998;21(9):1791-803.
50. Hord NG, Tang Y, Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2009;90(1):1-10.
51. T. H. Nitrate and nitrite: intake assessment. Geneva: World Health Organization, 2003.
52. Chung SY, Kim JS, Kim M, Hong MK, Lee JO, Kim CM, et al. Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. *Food Additives & Contaminants.* 2003;20(7):621.
53. Chung SWC, Tran JCH, Tong KSK, Chen MYY, Xiao Y, Ho YY, et al. Nitrate and nitrite levels in commonly consumed vegetables in Hong Kong. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance Communications.* 2011;4(1):34-41.

54. Jaworska G. Content of nitrates, nitrites, and oxalates in New Zealand spinach. Food Chemistry [Internet]. 2004; 89:[235–42 pp.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.030>.
55. Comissão Europeia. A directiva «Nitratos» da União Europeia. Água2010.
56. Meah MN HN, Davies A. Nitrate and nitrite in foods and the diet. Food Addit Contam. 1994.
57. P.Santamaria AE, F.Serio, E.Todaro. A survey of nitrate and oxalate content in fresh vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1999;79:1882-8.
58. Kanaan SSaE, C.D. Effect of climatic conditions and time of harvest on growth and tissue nitrate content of lettuce in nutrient film culture. Acta Hort (ISHS). 1993;323:75-80.
59. Premuzic Z, Gárate, A. and Bomilla, I. Yield and quality of greenhouse lettuce as affected by form of N fertiliser and light. Developments in Plant and Soil Sciences 2001;92:300-1.
60. Chung JC, Chou SS, Hwang DF. Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. Food Additives & Contaminants. 2004;21(4):317-22.
61. Huarte-Mendicoa JC, Astiasarán I, Bello J. Nitrate and nitrite levels in fresh and frozen broccoli. Effect of freezing and cooking. Food Chemistry. 1997;58(1):39-42.
62. Waclaw M, Stefan S. Effect of Culinary Processes on the Content of Nitrates and Nitrites in Potatoe. Pakistan Journal of Nutrition. 2004;3(6):357.
63. Rytel E, Golubowska G, Lisinska G, Peksa A, Aniolowski K. Changes in glycoalkaloid and nitrate contents in potatoes during French fries processing. J Sci Food Agric. 2005;85(5):879-82.
64. Schuster BEaL, K. Nitrate and Nitrite Methods of Analysis and Levels in Raw Carrots, Processed Carrots and in Selected Vegetables and Grain Products. Journal of Food Science. 1987;52(6):1632–6.
65. Roszczenko A, Rogalska, J., Potapczuk, L. and Kleczynska, A. Influence of thermal processing and storage on the content of nitrates and nitrites in chosen vegetables from the Podlasie province. Przegl Lek. 2001;58:30-4.
66. Prasad S, Chetty AA. Nitrate- N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing. Food Chemistry. 2008;106(2):772-80.

67. Leszczynska T, Filipiak-Florkiewicz A, Cieslik E, Sikora E, Pisulewski PM. Effects of some processing methods on nitrate and nitrite changes in cruciferous vegetables. *J Food Compos Anal.* 2009;22(4):315-21.
68. Stephany R.W. SPJ. The intake of nitrate, nitrite and volatile N-nitrosamines and the occurrence of volatile N-nitrosamines in human urine and veal calves. *Environmental aspects of N-Nitroso Compounds.* France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 1978. p. 443-60.
69. Doel JJ, Benjamin N, Hector MP, Rogers M, Allaker RP. Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(1):14-9.
70. Assembly of Life Science. The health effects of nitrate and N-Nitroso compounds: National Academy Press; 1981. Available from: <http://www.archive.org/details/healtheffectsofn004248mbp>.
71. Tamme T, Reinik M, Roasto M, Juhkam K, Tenno T, Kiis A. Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by the Estonian population. *Food Addit Contam.* 2006;23(4):355-61.
72. Correia M, Barroso Â, Barroso MF, Soares D, Oliveira MBPP, Delerue-Matos C. Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. *Food Chemistry.* 2010;120(4):960-6.
73. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1981;78(12):7764-8.
74. Rassaf T KP, Kelm M. Circulating NO pool in humans. *Kidney Blood Press Res [Internet].* 2005; 28:[341–8 pp.].
75. Comly HH. Cyanosis in Infants Caused by Nitrates in Well Water. *JAMA.* 1987.
76. Chan TYK. Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. *Toxicol Lett.* 2011;200(1-2):107-8.
77. Abnet CC. Carcinogenic food contaminants. *Cancer investigation.* 2007;25(3):189.
78. Ralt D. Does NO metabolism play a role in the effects of vegetables in health? Nitric oxide formation via the reduction of nitrites and nitrates. *Medical Hypotheses.* 2009;73(5):794-6.

79. PAHO Pan American Health Organization. Guiding Principles for complementary feeding of the breastfed child In: WHO, Washington DC 2003.
80. World Health Organization. Complementary feeding: report of the global consultation, and summary of guiding principles for complementary feeding of the breastfed child. 2002.
81. World Health Organization. Feeding the Non-Breastfed Child 6-24 months of age. In: Development DoCaAHa, Development DoNfHa, editors. 2004.
82. Sociedade Portuguesa de Pediatria (SPP). Acta Pediátrica Portuguesa. In: SPP CdNd, editor. Alimentação e Nutrição 2012.
83. Fontes ACO. Diversificação alimentar e implicações no desenvolvimento da criança : Monografia : Complementary feeding and implications on children's developing. In: Lemos DL, Figueiredo LF, editors.: Porto : edição de autor; 2009.
84. World Health Organization. Complementary feeding: Family foods for breastfed children. 2002.
85. Ana Isabel Silva HGA. Diversificação alimentar no primeiro ano de vida. Acta Med Port; 2011. p. 1035-40.
86. World Health Organization. Complementary feeding in the WHO Multicentre Growth Reference Study WHO Multicentre Growth Reference Study Group. Acta Paediatrica; 2006.
87. Caroli M, Mele RM, Tomaselli MA, Cammisa M, Longo F, Attolini E. Complementary feeding patterns in Europe with a special focus on Italy. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2012;22(10):813-8.
88. Richard E. Behrman RMK, Hal B. Jenson. Nelson Tratado de Pediatria. 17^a Edição ed2005.
89. Nestlé. Alimentação do bebé 2013 [10/02/2014]. Available from: <http://www.nestlebebe.pt/alimentacao-do-bebe>.
90. Nutribén - Alter S. Alimentação [10/02/2014]. Available from: <http://www.nutriben.pt/pagina/alimentacao>.
91. Milupa Comercial S. Diversificação alimentar [14/10/2014]. Available from: <http://www.aptababy.com.pt/6-12meses/Paginas/Default.aspx>.

92. Portugal C. Receitas dos 5 aos 9 meses 2014 [10/02/2014]. Available from: <http://www.chicco.pt/ProdutosChicco/Chiccopedia/Micrositedesname/Oquequandocomo/Dos5aos9meses.aspx>.
93. Direção-Geral de Saúde. A nova Roda dos Alimentos. In: FCNAUP.
94. Direção-Geral de Saúde. Frutos, Legumes e Hortalças. In: Candeias V, Emília Nunes CM, Manuela Cabral, Pedro Ribeiro da Silva 2005.
95. EFSA European Food Safety Authority. Nitrate in vegetables. 2008.
96. Alvito P. Contaminantes de origem química e biológica em alimentos para crianças. In: Carla Martins EV, Maria João Barreira, Rosália Furtado e Maria Antónia Calhau, editor.: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2013. p. 13.
97. Diretiva 91/676/CEE do Conselho relativa à protecção das águas contra a poluição causada por nitratos de origem agrícola (1991).
98. Decreto-Lei n.º 235/97 de 3 de Setembro, (1997).
99. Decreto-Lei n.º 68/99 de 11 de Março, (1999).
100. Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. Diretiva Nitratos [cited 2014 07/02/2014]. Available from: <http://www.dgadr.mamaot.pt/rec-hid/diretiva-nitratos>.
101. Diretiva 2006/125/CE de 5 de Dezembro de 2006. Alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens (2006).
102. Ierna A. Influence of harvest date on nitrate contents of three potato varieties for off-season production. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009;22(6):551-5.
103. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l- arginine/ nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*. 2007;851(1):51-70.
104. Andrade R, Viana CO, Guadagnin SG, Reyes FGR, Rath S. A flow- injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite determination through nitric oxide generation. *Food Chemistry*. 2003;80(4):597-602.

105. Ferreira I, Silva S. Quantification of residual nitrite and nitrate in ham by reverse- phase high performance liquid chromatography/ diode array detector. *Talanta*. 2008;74(5):1598-602.
106. Pinho O, Ferreira IMPLVO, Oliveira MBPP, Ferreira MA. FIA evaluation of nitrite and nitrate contents of liver pâtés. *Food Chemistry*. 1998;62(3):359-62.
107. Chetty AA, Prasad S. Flow injection analysis of nitrate- N determination in root vegetables: Study of the effects of cooking. *Food Chemistry*. 2009;116(2):561-6.
108. Man-fung S. Briefing Session on Analysis of Nitrate/Nitrite and Propionic Acid in Food. Food Safety B Section: Government Laboratory, HKSARG; 2008.
109. Brabcová M, Rychlovský P, Němcová I. Determination of Nitrites, Nitrates, and Their Mixtures Using Flow Injection Analysis with Spectrophotometric Detection. *Analytical Letters*. 2003;36(10):2303-16.
110. Reinik M. Nitrates, Nitrites, N-nitrosamines and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food: Analytical Methods, Occurrence and Dietary Intake 2007.
111. Croitoru MD. Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC- UV/ VIS technique. *Journal of Chromatography B*. 2012;911:154-61.
112. Hegedus O, Hegedusova A, Jakabova S, Vargova A, Pernyeszi T, Boros B. Evaluation of an HPIC Method for Determination of Nitrates in Vegetables. *Chromatographia*. 2010;71:S93-S7.
113. Hsu J, Arcot J, Alice Lee N. Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. *Food Chemistry*. 2009;115(1):334-9.
114. De Martin S, Restani P. Determination of nitrates by a novel ion chromatographic method: occurrence in leafy vegetables (organic and conventional) and exposure assessment for Italian consumers. *Food Addit Contam*. 2003;20(9):787-92.
115. Jimidar M, Hartmann C, Cousement N, Massart DL. Determination of nitrate and nitrite in vegetables by capillary electrophoresis with indirect detection. *Journal of Chromatography A*. 1995;706(1):479-92.
116. Sádecká J, Polonský J. Determination of inorganic ions in food and beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1999;834(1):401-17.

117. Melanson JE, Lucy CA. Ultra- rapid analysis of nitrate and nitrite by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2000;884(1):311-6.
118. Blatný P, Kvasnička F. Application of capillary isotachophoresis and capillary zone electrophoresis to the determination of inorganic ions in food and feed samples. *Journal of Chromatography A*. 1999;834(1):419-31.
119. Marshall PA, Trenerry VC. The determination of nitrite and nitrate in foods by capillary ion electrophoresis. *Food Chemistry*. 1996;57(2):339-45.
120. Merusi C, Corradini C, Cavazza A, Borromei C, Salvadeo P. Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal. *Food Chemistry*. 2010;120(2):615-20.
121. Ott-Borrelli KA, Koenig RT, Miles CA. A Comparison of Rapid Potentiometric and Colorimetric Methods for Measuring Tissue Nitrate Concentrations in Leafy Green Vegetables. *HortTechnology*. 2009;19(2):439-44.
122. Pinto E, Petisca C, Amaro L, Pinho O, Ferreira IPLVO. Influence of Different Extraction Conditions and Sample Pretreatments on Quantification of nitrate and nitrite in spinach and lettuce. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2010;33(5):591-602.
123. IPQ Instituto Português da Qualidade. Guia RELACRE 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Lisboa, Portugal: RELACRE - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; 2000.
124. CEN European Committee for Standardization, ISO. Water quality. Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions. Part 1: Determination of bromide, chloride, fluoride, nitrate, nitrite, phosphate and sulfate (ISO 10304-1:2007). 2009.
125. EPA Environmental Protection Agency. Method 9056A – Determination of inorganic anions by ion chromatography Washington DC2000.
126. EPA Environmental Protection Agency. Method 352.1 – Nitrogen, Nitrate (Colorimetric, Brucine) Cincinnati: National Exposure Research Laboratory; 1997.
127. ISO International Organization for Standardization. Method 7890–3: Water Quality — Determination of Nitrate — Part 3: Spectrometric Method using Sulfosalicylic Acid. Geneva1988.
128. ISO International Organization for Standardization. Method 6777–1: Water Quality — Determination of Nitrite — Molecular Absorption Spectrometric Method Geneva1984a.

129. ISO International Organization for Standardization. Method 13395: Water Quality — Determination of Nitrite Nitrogen and Nitrate Nitrogen and the Sum of Both by Flow Analysis (Continuous Flow Analysis and Flow Injection Analysis) Geneva 1996.
130. APHA APH-, AWWA AAWWA-, WEF WEF-. Method 4110 B - Ion Chromatography with Chemical Suppression of Eluent Conductivity Washington DC 2005a.
131. APHA American Public Health, APH Association/American Water Works Association, AWWA Water Environment Federation, WEF. Method 4110 C. Single-Column Ion Chromatography with Direct Conductivity Detection Washington DC 2005b.
132. APHA American Public Health, APH Association/American Water Works Association, AWWA Water Environment Federation, WEF. Method 4140. Inorganic Anions By Capillary Ion Electrophoresis Washington DC 2005.
133. APHA American Public Health, APH Association/American Water Works Association, AWWA Water Environment Federation, WEF. Method 4500 - NO₃-Nitrogen (Nitrate) Washington DC 2005.
134. AOAC International. Method 993.30 - Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Ed ed. Gaithersburg 2000.
135. ASTM American Society for Testing and Materials. Standard test method for anions in water by chemically suppressed ion chromatography. ASTM D4327. Conshohocken: Annual Book of ASTM Standards; 1997.
136. ASTM American Society for Testing and Materials. ASTM D6508 - Standard test method for determination of dissolved inorganic anions in aqueous matrices using capillary ion electrophoresis and chromate electrolyte. Conshohocken: Annual Book of ASTM Standards; 2000.
137. ASTM American Society for Testing and Materials. ASTM D3867-04 - Standard Test Methods for Nitrite-Nitrate in Water. Conshohocken 2004.
138. AOAC International. Method 973.50 - Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Ed ed. Gaithersburg 2000.
139. CEN European Committee for Standardization. Foodstuffs. Determination of nitrate and /or nitrite content. Part 7: Continuous flow method for the determination of nitrate content of vegetables and vegetable products after Cadmiun reduction. 1998.

140. CEN European Committee for Standardization.. Foodstuffs. Determination of nitrate and/or nitrite content. Part 5: Enzymatic determination of nitrate content of vegetable-containing food for babies and infants. 1997.
141. American Society for Microbiology. Nitrate and Nitrite Reduction Test Protocols 2011 [cited 2013 17/10/2013]. Available from: <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3660-nitrate-and-nitrite-reduction-test-protocols>.
142. Baptista RMF. Corantes azo para impressão a jacto de tinta com boa solidez à água. In: Moura JPd, editor. 2005.
143. M.A. Koupparis^a KMW, H.V. Malmstadt. Automated determination of nitrate in waters with a reduction column in a microcomputer-based stopped-flow sample processing system. Anal Chim Acta. 1982:119–27.
144. Madsen BC. Utilization of flow injection with hydrazine reduction and photometric detection for the determination of nitrate in rain-water. Anal Chim Acta. 1981;124:437–41.
145. RELACRE. Guia RELACRE 3. Validação de resultados em laboratórios químicos 1996.
146. IPQ Instituto Português da Qualidade. NP EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração 2005.
147. RELACRE. Guia RELACRE 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Lisboa, Portugal: RELACRE - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; 2000.
148. EURACHEM/CITAC. Guide to Quality in Analytical Chemistry An Aid to Accreditation 2002.
149. EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 1998.
150. Comissão das Comunidades Europeias. Desempenho de métodos analíticos e interpretação de resultados (2002).
151. ISO International Organization for Standardization. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. Geneva 1990.

152. Barbosa S. Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2012.
153. Barreira M. Ocorrência da patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças: otimização e validação do método de análise por SPE-HPLC-UV. Dissertação para obtenção do grau de Mestre: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2009.
154. Instituto Português de Acreditação. Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos. 2011.
155. ISO International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions. Geneva1994.
156. ISO International Organization for Standardization. Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: General statistical terms and terms used in probability. Geneva2006.
157. ISO International Organization for Standardization. Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: General statistical terms and terms used in probability. ISO 3534-1. Geneva2006.
158. INSA Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Controlo interno da qualidade em análise química In: Silva MMMd, editor. Validação de métodos e controlo da qualidade em análise química e microbiológica de águas Ministério da Saúde ed2008.
159. ISO International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values. Geneva1994.
160. ISO International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method. Geneva1994.
161. Technologies A. Validation of Analytical Methods. In: Ludwig Huber U, ICH, FDA, editor. 2010.
162. ISO International Organization for Standardization. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. Geneva1990.

163. ASAE Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Riscos e Alimentos - Produtos hortofrutícolas. Nitratos - avaliação dos resultados do controlo oficial 2011.
164. Direção-Geral de Saúde. Programa Nacional de Saúde Infantil e Juvenil. Ministério da Saúde; 2013.
165. Henriques M. Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: optimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS. Dissertação para obtenção do grau de Mestre: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2008.

Anexos

Anexo A

Classificação teórica dos vegetais de acordo com a sua concentração de nitratos

Tabela A.1 – Classificação dos vegetais de acordo com a sua concentração de nitratos, segundo o descrito na literatura (9, 10, 95).

Teor de nitratos no produto fresco	Espécie vegetal	Família
Muito baixo (inferior a 200 mg/kg)	Espargos (<i>Asparagus officinalis</i> L.)	<i>Asparagaceae</i>
	Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	<i>Liliaceae</i>
	Alcachofra (<i>Cynara cardunculus</i> L.)	<i>Asteraceae</i>
	Couve-de-bruxelas (<i>Brassica oleracea</i> , grupo <i>Gemmifera</i>)	<i>Brassicaceae</i>
	Batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i> L.)	<i>Convolvulaceae</i>
	Cebola (<i>Allium cepa</i> L.)	<i>Alliaceae</i>
	Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	<i>Fabaceae</i>
	Ervilha (<i>Pisum sativum</i> L.)	<i>Fabaceae</i>
	Fava (<i>Vicia faba</i> L.)	<i>Fabaceae</i>
	Feijão verde (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	<i>Fabaceae</i>
	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	<i>Solanaceae</i>
	Pimento (<i>Capsicum annum</i> L.)	<i>Solanaceae</i>
	Batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	<i>Solanaceae</i>
	Beringela (<i>Solanum melongena</i> L.)	<i>Solanaceae</i>

Tabela A.2 – Classificação dos vegetais de acordo com a sua concentração de nitratos, segundo o descrito na literatura (9, 10, 95) (continuação).

Teor de nitratos no produto fresco	Espécie vegetal	Família
Baixo (entre 200-500 mg/kg)	Brócolos (<i>Brassica oleracea</i> , grupo Italica)	<i>Brassicaceae</i>
	Couve-flor (<i>Brassica oleracea</i> , grupo Botrytis)	<i>Brassicaceae</i>
	Couve-roxa (<i>Brassica oleracea</i> , grupo Capitata Rubra)	<i>Brassicaceae</i>
	Courgette (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	<i>Cucurbitaceae</i>
	Pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.)	<i>Cucurbitaceae</i>
	Abóbora (<i>Cucurbita</i> L.)	<i>Cucurbitaceae</i>
	Chicória (<i>Cichorium intybus</i>)	<i>Asteraceae</i>
	Cenoura (<i>Daucus carota</i> L.)	<i>Apiaceae</i>
Intermédio (entre 500-1000 mg/kg)	Couve coração-de-boi (<i>Brassica oleracea</i> , grupo Capitata)	<i>Brassicaceae</i>
	Couve-lombarda (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabauda</i> L.)	<i>Brassicaceae</i>
	Couve-galega (<i>Brassica oleracea</i> , grupo Acephala)	<i>Brassicaceae</i>
	Nabo (<i>Brassica rapa</i> L.)	<i>Brassicaceae</i>
	Alface-iceberg (<i>Lactuca sativa</i> var. <i>capitata</i>)	<i>Asteraceae</i>
	Raiz de aipo (<i>Apium graveolens</i> L., var. <i>rapaceum</i>)	<i>Apiaceae</i>

Tabela A.3 – Classificação dos vegetais de acordo com a sua concentração de nitratos, segundo o descrito na literatura (9, 10, 95) (continuação).

Teor de nitratos no produto fresco	Espécie vegetal	Família
Elevado (entre 1000-2500 mg/kg)	Salsa (<i>Petroselinum crispum</i>)	<i>Apiaceae</i>
	Funcho (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	<i>Apiaceae</i>
	Coentro (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	<i>Apiaceae</i>
	Aipo (<i>Apium graveolens</i> Mill., var. <i>dulce</i>)	<i>Apiaceae</i>
	Endívia (<i>Cichorium endívia</i> L.)	<i>Asteraceae</i>
	Alface-frisada (<i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i>)	<i>Asteraceae</i>
	Alho-francês (<i>Allium porrum</i> L.)	<i>Alliaceae</i>
	Beterraba (<i>Beta</i> L.)	<i>Amaranthaceae</i>
	Acelga (<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i> L.)	<i>Amaranthaceae</i>
	Rabanete (<i>Raphanus sativus</i> L.)	<i>Brassicaceae</i>
	Couve-chinesa (<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i>)	<i>Brassicaceae</i>
Muito elevado (superior a 2500 mg/kg)	Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	<i>Asteraceae</i>
	Espinafre (<i>Spinacia oleracea</i> L.)	<i>Amaranthaceae</i>
	Agrião (<i>Lepidium sativum</i> L.)	<i>Brassicaceae</i>
	Rúcula (<i>Eruca sativa</i> Mill.)	<i>Brassicaceae</i>
	Canónigos (<i>Valerianella locusta</i>)	<i>Valerianaceae</i>

ANEXO B

MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS (123, 151)

O método dos mínimos quadrados pressupõe o cálculo de parâmetros de calibração, tendo como base, a equação da reta de regressão.

A forma algébrica da equação de uma reta é dada por:

$$y = a + bx \quad \text{(equação 16)}$$

Em que a representa a ordenada na origem, b o declive da reta, e x os valores individuais de concentração conhecida na solução padrão.

Esta reta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes, $(x_1, y_1); (x_2, y_2); \dots; (x_n, y_n)$, sendo n o número de pontos que constituem a reta. O ponto (x_1, y_1) pertence geralmente ao branco. A média de valores de x (concentração dos padrões utilizados) representa-se por \bar{x} e a média dos valores de y (sinal instrumental) representa-se por \bar{y} .

O cálculo do coeficiente de correlação (R ou ρ) pode ser utilizado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica(123)(123)(123)(123)(123)(123).

$$R = \frac{\sum_{i=1}^N \{(xi - \bar{x})(yi - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^N (xi - \bar{x})^2 \cdot \left\{ \sum_{i=1}^N (yi - \bar{y})^2 \right\} \right]}} \quad (\text{equação 17})$$

O coeficiente de correlação pode apresentar valores entre -1 (correlação e declive negativos) e +1 (correlação e declive positivos) ($-1 \leq \rho \leq +1$). Para que a linearidade seja considerada válida, o coeficiente de correlação deverá ter valores superiores a 0,995, aproximando-se o mais possível de 1, revelando assim um melhor ajuste dos pontos à reta e maior qualidade nos resultados obtidos.

O coeficiente de determinação da reta (R^2) é dado pelo quadrado do coeficiente de correlação.

Pelo método dos mínimos quadrados demonstra-se ainda que os coeficientes a e b da reta de regressão são dados por:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{equação 18})$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (\text{equação 19})$$

Onde:

x_i representa os valores individuais de concentração;

y_i representa os valores individuais do sinal instrumental;

\bar{x} representa a média dos valores de x (concentração dos padrões utilizados);

\bar{y} representa a média dos valores de y (sinal instrumental).

Os coeficientes a e b dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ($S_{y/x}$) da reta de regressão:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{N - 2}} \quad (\text{equação 20})$$

Este desvio padrão expressa a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração. Os desvios padrão do declive (S_b) e da ordenada na origem (S_a), são dados por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{equação 21})$$

$$S_a = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{equação 22})$$

e podem ser usados para calcular os limites de confiança de a e b :

$$b \pm t \cdot S_b \quad (\text{equação 23})$$

$$a \pm t \cdot S_a \quad (\text{equação 24})$$

sendo t o valor da variável de *Student* para o nível de confiança desejado e $(N - 2)$ graus de liberdade.

O desvio padrão do método (S_m) é um parâmetro utilizado para avaliar a qualidade de trabalho do analista e pode ser dado pela expressão:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (\text{equação 25})$$

O coeficiente de variação do método (CV_m) permite comparar diferentes calibrações e métodos analíticos e é expresso, em %, pela equação:

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (\text{equação 26})$$

Após a definição da reta de calibração e determinação dos coeficientes a e b , podemos obter a concentração do analito-alvo (x_0) a partir de um sinal instrumental (y_0), ou do valor médio obtido a partir de uma série de replicados, independentes (\bar{y}_0) da mesma amostra, segundo as equações:

$$\bar{X} = \frac{y_0 - a}{b} \quad (\text{equação 27})$$

$$\bar{X} = \frac{\bar{y}_0 - a}{b} \quad (\text{equação 28})$$

Os limites de confiança de x_0 podem ser calculados pela equação:

$$x_0 \pm t \cdot S_{x_0} \quad (\text{equação 29})$$

em que t representa a variável de Student para (N-2) graus de liberdade, a determinado nível de confiança.

ANEXO C

TESTE DAS ÁREAS NORMALIZADAS (153, 165)

A distribuição dos valores normalizados tem como objetivo a avaliação da dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores ótimos, de forma a que não seja superior a um intervalo previamente estabelecido.

A partir da equação da reta obtida na regressão linear, estimam-se as áreas referentes às concentrações utilizadas. Para cada uma dessas áreas, calcula-se a razão entre o valor da área obtida experimentalmente e o valor da área estimada através da regressão linear. A concentração para a qual esta razão de aproxima mais de 1 é denominada C_{100} , e corresponde à concentração do ponto experimental com melhor correlação.

A área normalizada é definida pela seguinte equação, que é aplicada a cada valor de concentração obtido:

$$\text{Área Normalizada} = \frac{\left(\frac{A_i}{C_i}\right) \times (100 \times C_{100})}{A_{100}} \quad (\text{equação 30})$$

Onde:

A_i representa a área do pico correspondente a uma determinada concentração;

C_i representa a concentração correspondente à área A_i ;

A_{100} representa a área do pico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação;

C_{100} representa a concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação.

Após o cálculo destes valores, é traçado um gráfico de valores normalizados *versus* a concentração (mg/L).

Para admitir a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores normalizados não podiam ter um desvio superior a 15%, isto é, deverão estar compreendidos entre 85 e 115%.

Sempre que se verifiquem valores normalizados que apresentem um desvio superior a 15%, estes devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

O termo “áreas” é utilizado exclusivamente a título explicativo, uma vez que é o termo original empregue neste teste. Posteriormente, na aplicação da validação do método analítico, este termo foi substituído pela unidade em estudo, a absorvância.

ANEXO D

ANÁLISE DE RESÍDUOS (153, 165)

A análise de resíduos é um bom indicador de linearidade, na medida em que se baseia na avaliação da distância entre os valores de y experimentais e os valores de y' ideais da reta de calibração. A determinação dos resíduos implica a representação gráfica destes valores em função das concentrações, dando origem a um conjunto de pontos que se dispõem aleatoriamente em torno do eixo dos x .

Para admitir a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores devem apresentar um desvio igual ou inferior a 15%, ou seja, estar compreendidos entre 0 e 15%. Sempre que existam resíduos que apresentem um desvio superior a 15%, devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos.

A absorvância estimada (y') é calculada com base na equação da reta obtida para o composto em estudo:

$$y' = a + bx \quad \text{(equação 31)}$$

Onde:

a representa a ordenada na origem (correspondente à equação da reta de calibração para o analito);

b representa o declive da reta;

x representa os valores individuais de concentração conhecida na solução-padrão.

O resíduo representa o quociente entre os valores experimentais e os valores estimados da área da reta de calibração, em percentagem.

Após o cálculo destes valores, é traçado um gráfico de resíduos (%) versus concentração (mg/L).

ANEXO E

TESTE DE RIKILT (153, 165)

O teste de RIKILT permite a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração, através da elaboração de um gráfico de linearidade, de modo a avaliar o seu comportamento linear. Para cada concentração x_i e para cada sinal instrumental y_i , é determinada a razão y_i/x_i .

Posteriormente, é calculada a média de todas as razões y_i/x_i para todos os pontos de calibração ($\overline{y/x}$). Ao valor médio é atribuído um valor de 100% e é calculada a percentagem de cada valor y_i/x_i em relação ao valor médio, de acordo com a seguinte expressão:

$$\frac{y_i}{x_i}(\%) = 100 \cdot \frac{\frac{y_i}{x_i}}{\overline{y/x}} \quad (\text{equação 32})$$

É traçado um gráfico que apresenta o valor das concentrações no eixo dos x , e o valor, em percentagem, da razão y_i/x_i calculada, no eixo dos y .

Para uma linearidade perfeita, esta razão deve aproximar-se o mais possível de 100%. Como tal não acontece em todos os pontos de calibração, para admitir linearidade numa determinada gama de trabalho, definiu-se que a razão percentual de y_i/x_i não deve apresentar um valor de desvio superior a 10%, ou seja, os valores devem estar compreendidos entre 90 e 110%. Caso existam valores que se encontrem fora deste intervalo, esses valores devem ser rejeitados e aplicado novamente o teste de RIKILT à gama de trabalho reduzida, até que se verifiquem os requisitos estabelecidos.

ANEXO F

TESTE DE MANDEL OU TESTE DE FISHER/SNEDECOR (123, 151, 153)

De acordo com a norma ISO 8466-1:1990, a linearidade de um método analítico pode ser avaliada através de um modelo estatístico, pelo teste de Fisher/Snedecor ou teste de Mandel.

A partir de um conjunto de pares ordenados (sinal instrumental *versus* concentração), calcula-se a função de calibração linear (ISO 8466-1:1990) e a função de calibração não linear (ISO 8466-2:2001), bem como os respectivos desvios-padrão residuais $S_{y/x}$ e S_{y^2} .

A diferença de variâncias (DS^2) é calculada através da equação:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2 \quad (\text{equação 33})$$

Onde:

$S_{y/x}$ representa o desvio padrão residual linear;

S_{y^2} representa o desvio padrão residual não linear;

N representa o número de padrões de calibração.

Os desvios padrões residuais são calculados do seguinte modo:

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}} \quad (\text{equação 34})$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N - 3}} \quad (\text{equação 35})$$

Onde:

N representa o número de padrões de calibração;

Y_i representa o sinal obtido para um padrão de determinada concentração;

\bar{y}_i representa o sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração;

\bar{y}_{i2} representa o sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração.

Por fim calcula-se o valor teste (PG ou VT) segundo a equação:

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (\text{equação 36})$$

O valor de teste calculado é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor, para um grau de confiança de 95%.

Critérios de aceitação:

- a) Se $VT \leq F$, a função de calibração polinomial é linear, conduzindo a um bom ajuste dos pontos experimentais;
- b) Se $VT > F$, a função de calibração é não linear, pelo que deve ser avaliada a possibilidade de reduzir a gama de trabalho ou, caso não seja possível, deve ser utilizada uma função de calibração não linear.

ANEXO G

TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS (123, 151, 153)

O teste de homogeneidade de variâncias avalia se o intervalo de concentrações do intervalo de linearidade está bem ajustado, através da análise das variâncias (S^2) dos padrões que delimitam a reta de calibração.

As variâncias associadas ao primeiro e último padrão (S^2_1 e S^2_{10}) determinam-se segundo a equação:

$$S_t^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{equação 37})$$

Sendo:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (\text{equação 38})$$

Para $i=1$ e $i=10$.

Onde:

i representa o número do padrão (pode assumir valores de 1 a 10);

j representa o número de repetições efetuadas para cada padrão.

Para verificar se existem diferenças significativas entre as variâncias dos padrões que limitam a gama de trabalho, é necessário calcular o valor de teste (PG ou VT) de acordo com as equações:

$$\text{a) } PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad (\text{equação 39})$$

$$\text{b) } PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad (\text{equação 40})$$

Sendo:

- a) Quando $S_{10}^2 > S_1^2$
- b) Quando $S_1^2 > S_{10}^2$

O valor de PG é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor, para N-1 graus de liberdade e um grau de confiança de 99%:

- a) Se $PG \leq F$, não existem diferenças significativas entre as variâncias e, portanto, a gama de trabalho está bem ajustada;
- b) Se $PG > F$, as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias correspondentes ao primeiro e ao último padrão permitam inverter o resultado ($PG \leq F$)